Aus dem Institut für Toxikologie

Universität Düsseldorf

(Dir.: Prof. Dr. med. F. K. Ohnesorge)

In vivo - Versuche zur Wirkung parenteraler Cadmium - Gaben auf die CCl_4 - stimulierte Lipidperoxidation bei Ratten

Dissertation

zur Erlangung

des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der

Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Eleonore Sänger

1984

Aus dem Institut für Toxikologie

Universität Düsseldorf

(Dir.: Prof. Dr. med. F. K. Ohnesorge)

In vivo - Versuche zur Wirkung parenteraler Cadmium - Gaben auf die CCl_4 - stimulierte Lipidperoxidation bei Ratten

Dissertation

zur Erlangung

des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der

Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Eleonore Sänger

1984

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr. Ohnesorge

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Sies

Tag der mündlichen Prüfung: 18.1.1984

Herrn Prof. Dr. med. F.K. Ohnesorge möchte ich danken für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die intensive Förderung durch zahlreiche wertvolle Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. med. H. Sies gilt mein Dank für das entgegengebrachte Interesse und für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich Herrn Dr. H. Menzel, der mich in das Arbeitsfeld einführte, mich bei Operationen und Bestimmungen unterstützte und dem ich manchen Diskussionsbeitrag verdanke.

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

		Seite
I.	Einleitung	1
I.1	Die toxikologische Bedeutung von Cadmium und die Funktion von Cadmium-Thionein	1
I.2	Bedeutung der Lipidperoxidation	4
I.3	Chemie der Lipidperoxidation	7
I.4	Messung der Lipidperoxidation	11
I.5	Schutzmechanismen	13
I.5.1	Funktion der Superoxiddismutase	14
I.5.2	Funktion des α-Tocopherol	15
I.5.3	Funktion der GSH-Peroxidase (GSH-Px)	16
I.5.4	Bedeutung des Glutathion (GSH)	18
I.6	Fragestellung	20
II.	Material und Methodik	23
II.1	Chemikalien	23
II.2	Vorbehandlung der Tiere	25

		Seite
II.3	Labortechnische Untersuchungen	26
II.3.1	Messung der Alkanproduktion	26
II.3.2	Messung von Cytochrom P-450	29
II.4	Versuchsplanung	31
II.4.1	Einteilung der Versuche	31
II.4.2	Zusammenstellung der Versuchsgruppen	33
II.5	Statistische Auswertung	37
III.	Ergebnisse	38
III.1	Alkanproduktion	38
III.1.1	Alkanproduktion bei unbehandelten Ratten	38
III.1.2	Alkanproduktion nach Stimulation der Lipidperoxidation mit CCl_4	41
III.1.3	Alkanproduktion nach Cadmium-Exposition	44
III.1.4	Alkanproduktion nach Cadmium- und CCl_4-Exposition	48

		Seite
III.2	Cytochrom P-450	51
III.2.1	Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber bei unbehandelten Ratten	51
III.2.2	Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber nach CCl_4-Applikation	53
III.2.3	Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber nach Cadmium-Exposition	56
III.2.4	Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber nach Cadmium- und CCl_4-Exposition	59
III.3	Andere labortechnische Untersuchungen	61
III.3.1	Gehalt an GSH und säurelöslichen Thiolen in der Leber	61
III.3.2	Thioneinsynthese in der Leber	63
IV.	Diskussion	65
IV.1	Problematik der Bestimmung gasförmiger Kohlenwasserstoffe in vivo	65
IV.2	Der Einfluß verschiedener Faktoren auf die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation	68

		Seite
IV.2.1	Einfluß der Nahrung auf die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation	68
IV.2.2	Der Einfluß endogener Faktoren auf die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation	72
IV.2.3	Einfluß der Sauerstoffkonzentration auf die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation	74
IV.2.4	Die Wirkung von CCl_4 auf den Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber	75
IV.2.5	Einfluß des Fastens auf den GSH-Gehalt der Leber	76
IV.3	Der Einfluß von Cadmium auf die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation in vivo	77
IV.3.1	Vergleich mit in vitro-Versuchen in der Literatur	77
IV.3.2	Die mögliche Schutzwirkung des Metallothionein	80
IV.3.3	Bedeutung des Cytochrom P-450 für die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation	82
IV.3.4	Der Einfluß des Energiestoffwechsels auf die Lipidperoxidation	85

Seite

IV.3.5 Der Einfluß anderer Faktoren auf die Lipidperoxidation 86

IV.3.6 Schlußfolgerungen 87

V. Zusammenfassung 89

VI. Anhang 91

VII. Literatur 96

I. Einleitung

I.1. Die toxikologische Bedeutung von Cadmium und die Funktion von Cadmium - Thionein

Schwermetalle gehören zu den "unintentional food additives"; überhöhte Konzentrationen in Lebensmitteln können gesundheitsschädigend wirken. Neben Blei und Quecksilber hat insbesondere Cadmium eine immer größer werdende Verbreitung in der Umwelt erfahren. Dieses Metall hat eine traurige Berühmtheit erlangt, weil es als wesentliche Ursache der Itai-Itai-Erkrankung erkannt wurde, die in den Fünfziger-Jahren in Japan endemisch auftrat.

Die Cadmium - Ausscheidung ist außerordentlich gering (3 µg/l Urin) (Friberg et al., 1979). Die biologische Halbwertszeit wird beim Menschen auf 20 Jahre und mehr geschätzt (Friberg et al., 1979). Möglicherweise hängt sie von der Höhe der zugeführten Dosis ab (Tsuchiya et al., 1978).

Cadmium wird zunächst dosisabhängig zu 50 % und mehr in der Leber an die Proteine des Cytosol gebunden (Samarawickrama, 1979). Jedoch liegen unterschiedliche Angaben über die Verteilung der Metallionen in der Leber vor (Samarawickrama, 1979).

Die Umverteilung der Metallionen aus der cytosolischen Proteinfraktion korreliert mit der Synthese des Thionein, die nach 4 - 5 Stunden einsetzt (Webb, 1979). Bei weiblichen Ratten sind 5 % der injizierten Cadmiumdosis bereits nach einer Stunde an Thionein gebunden. Vermutlich besteht ein kompetitiver Mechanismus zwischen Zink und Cadmium um das Zinkthionein, das in geringer Konzentration in der Leber nachgewiesen wurde (Webb, 1979).

Thioneine sind charakterisiert durch einen hohen Anteil an Cystein (30 %) und das Fehlen aromatischer Aminosäuren (Kägi et al., 1974; Weser et al., 1973). Für die Bindung eines Cadmiumions werden drei Cysteinreste benötigt (Kägi et al., 1974). Die chemische Bindung erfolgt über die SH-Gruppen des Cystein.

Durch die Thioneinbildung in der Leber werden zunächst andere Organe, besonders die Nieren, geschützt. Die Niere gilt als das Zielorgan der toxischen Cadmiumwirkung. Durch die Thioneininduktion wird der weitaus größte Teil des Cadmium an dieses niedermolekulare Protein gebunden (Weser et al., 1973). Metallothionein kann offenbar dadurch vor akuten Schädigungen durch Cadmium schützen (Webb, 1979).

Die Fähigkeit der Leber, Cadmiumthionein zu produzieren, ist offenbar beschränkt (Webb, 1979). Als Ursache wird weniger eine Begrenzung in der Thioneinsynthese als vielmehr eine begrenzte Aufnahmefähigkeit des Cadmium durch die Leber bei hohen Dosierungen diskutiert (Webb, 1979).

In den Nieren werden die ausgeprägtesten pathologischen Veränderungen in den proximalen Tubuli gefunden. Sie sollen mit der renalen Thioneininduktion zusammenhängen (Webb, 1979). Das in der Leber primär gespeicherte Cadmium wird allmählich zu Lasten der Niere umverteilt. Bei einer Belastung mit Cadmium ist deshalb zunächst die Konzentration in diesem Organ niedriger als in der Leber, später jedoch um ein Vielfaches höher.

I.2. Bedeutung der Lipidperoxidation

Als Basismechanismus für die Cadmium-Toxizität wird von mehreren Autoren die Lipidperoxidation postuliert (Omaye und Tappel, 1975; Gabor et al., 1978; Magos und Webb, 1980; Reddy et al., 1981). Der Stand der in den letzten Jahren intensivierten Forschung auf dem Gebiet der Lipidperoxidation ist in einigen Übersichtsreferaten dargestellt (Plaa und Witschi, 1976; Recknagel und Glende, 1977; Bus und Gibson, 1979; Kappus und Sies, 1981).

Reaktive Sauerstoffspezies wie $O_2^{\cdot -}$ (Superoxid-Radikal), $^1O_2$ (Singlet Oxygen), H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) und $OH^{\cdot}$ (Hydroxylradikal) werden inzwischen zwar als normale Stoffwechselprodukte angesehen, können jedoch auch die Lipidperoxidation auslösen (Flohé et al., 1976; Nohl, 1981; Winterbourn, 1981). Diese Radikale sind vermutlich an so wichtigen Reaktionen wie z. B. der Biosynthese von Thyroxin und Dopamin ursächlich beteiligt (Flohé et al., 1976). Ferner spielen sie wahrscheinlich bei der Phagocytose eine wichtige Rolle (Noelle und Lawrence, 1981; Nohl, 1981; Rosen und Klebanoff, 1981). Dabei dürfte der Kontakt mit Fremdprotein die Bildung von $O_2^{\cdot -}$ - und anderen Radikalen hervorrufen, die die phagocytierten Mikroorganismen abtöten (Nohl, 1981). Diese Beispiele zeigen, daß reaktive Sauerstoffspezies für den Organismus lebensnotwendig sind.

Offenbar kann es aber leicht zu einem Überschuß von $O_2^{\cdot -}$, $^1O_2$ und $\dot{O}H$ kommen. Außerdem sind die zellulären Membranen der Mitochondrien und des endoplasmatischen Reticulum für den Angriff dieser Radikale besonders empfänglich (Bus und Gibson, 1979). Diese Membranen sind reich an ungesättigten Fetten und können deshalb leicht oxidiert werden. So wird die Lipidperoxidation auch für die durch Sauerstoff verursachte Toxizität verantwortlich gemacht (Plaa und Witschi, 1976; Recknagel und Glende, 1977). Ferner wird das Auftreten des Lipofuscin als Zeichen einer Überschußbildung von $O_2^{\cdot -}$ - Radikalen angesehen (Nohl, 1981) und auf Peroxidationsreaktionen von Lipiden zurückgeführt (Kappus und Sies, 1981).

Es wird angenommen, daß die Lipidperoxidation beim Alterungsprozeß eine wichtige Rolle spielt (Plaa und Witschi, 1976). Die Lipidperoxidation wird außerdem mit der Atherosklerose und mit bestimmten Hämoglobinopathien, z. B. der ß-Thalassämie, in Zusammenhang gebracht (Plaa und Witschi, 1976; Nohl, 1981). Kappus und Sies (1981) weisen ferner auf die mögliche Rolle von bestimmten Lipidperoxidationsprodukten, besonders von Malondialdehyd, bei der Carcinogenese hin.

Außer den reaktiven Sauerstoffspezies kann

auch eine Vielzahl von Chemikalien die Lipidperoxidation auslösen (Bus und Gibson, 1979). Am besten untersucht ist die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation (Slater, 1966; Slater und Sawyer, 1971; Recknagel, 1967; Recknagel und Glende, 1973; Kornbrust und Mavis, 1980). Die nach CCl_4-Applikation beobachtete Hepatotoxizität wird auf peroxidative Veränderungen der cellulären Lipide zurückgeführt. Umstritten bleibt jedoch nach wie vor, ob direkte Wechselbeziehungen zwischen dem Ausmaß der Zellbeschädigung und der Lipidperoxidation bestehen (Burk und Lane, 1979; Colby et al., 1981; De Ruiter et al., 1980; Hafemann und Hoekstra, 1977; Lindstrom und Anders, 1978).

I.3. Chemie der Lipidperoxidation

Die entscheidende Funktion im Stoffwechsel körpereigener und -fremder Stoffe kommt der Leber zu. Das Enzymsystem ist in den Mikrosomen lokalisiert und besteht aus mehreren Cytochrom-P-450-Formen, NADPH-Cytochrom-c-Reduktase und Phospholipiden, die Komponenten der Membranen des endoplasmatischen Reticulum sind (Cooper et al., 1975; Plaa und Witschi, 1976; Recknagel und Glende, 1977). Dadurch ist dieses Enzymsystem streng strukturgebunden. Es stellt einen der wichtigsten Abbauwege im Arzneimittelstoffwechsel dar. Die Bedeutung dieses Enzymsystems geht auch daraus hervor, daß bis zu 40 % der in den Mikrosomen enthaltenen Proteine auf das Monooxygenasesystem entfallen (Stier, 1976).

Der Stoffwechsel zahlreicher Arzneimittel zeigt große Ähnlichkeit mit der sogenannten enzymatischen, d. h. NADPH-Cytochrom P450 abhängigen Lipidperoxidation. Dabei werden Radikale gebildet, die analog den reaktiven Sauerstoffspezies auf die Membranlipide wirken. Die enzymatische Lipidperoxidation wurde bisher nur in den Mikrosomen beobachtet.

Als das Hauptprodukt des CCl_4- Metabolismus wird $\dot{C}Cl_3$ angesehen (Recknagel und Glende, 1977; Bus und Gibson, 1979). Es bindet sich irreversibel an Proteine und Lipide (Ahr et al., 1980). Für die Aktivierung von CCl_4 zu einem freien Radikal wird das Cytochrom P-450 verantwortlich gemacht (Recknagel und Glende, 1977).

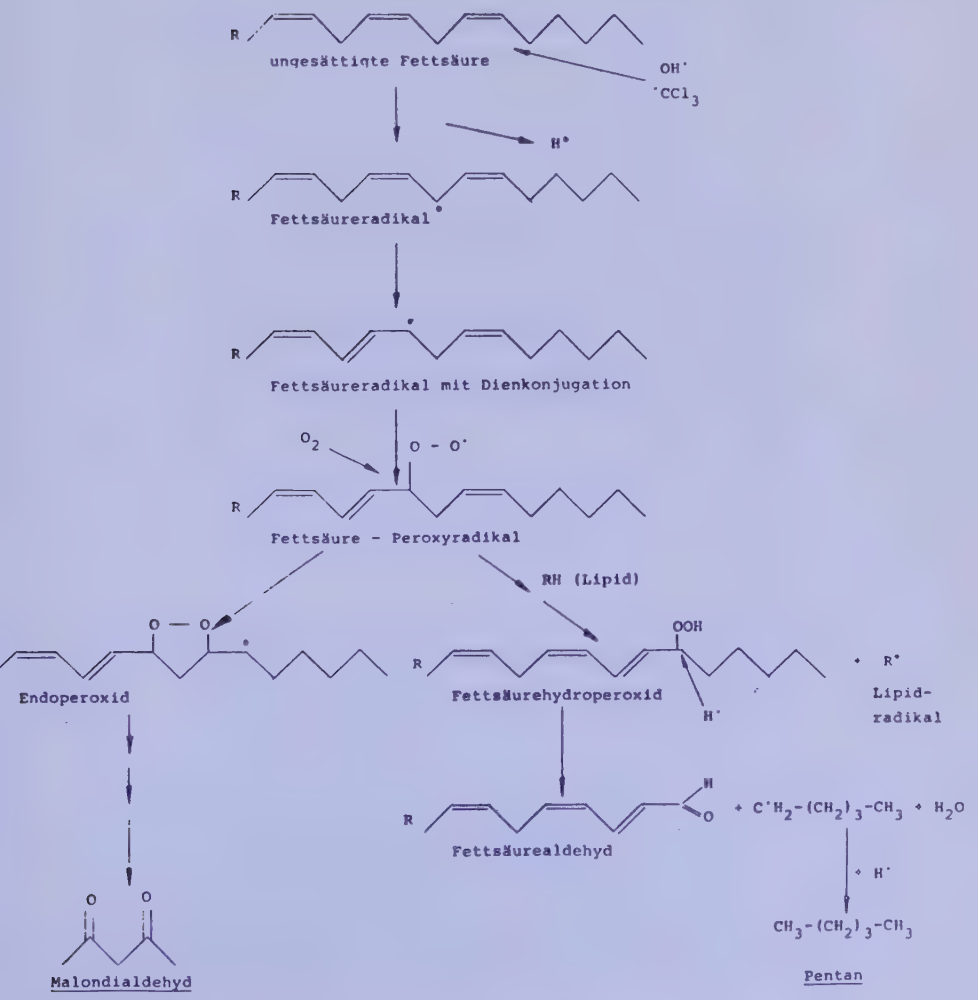
In geringem Umfang entsteht aus CCl_4 auch $CHCl_3$ (Reiner et al., 1972).

Eine weitere Form der Lipidperoxidation wird als nicht-enzymatisch bezeichnet und findet wahrscheinlich in allen Organellen statt, vorwiegend in den Mitochondrien und Mikrosomen. Auf ihren Mechanismus soll hier nicht eingegangen werden.

Bei der enzymatischen Lipidperoxidation wird unterschieden zwischen ihrer Startreaktion und ihrer Propagierung. Zu der Startreaktion zählt die Bildung reaktiver Metabolite und die dadurch bedingte Transformierung der Fettsäuren zu Dienkonjugierten Fettsäure-Radikalen. Die Propagierung führt zum Zerfall der Fettsäure-Radikale und zur Entstehung von Malondialdehyd und Alkanen (s. Abb. 1).

Abb. 1

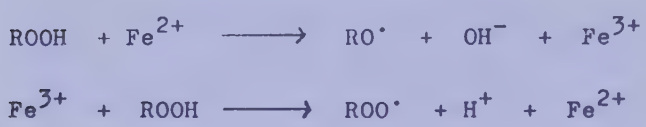
Der Mechanismus der Propagierung der Lipidperoxidation und die Bildung von Malondialdehyd sind in Abb. 1 dargestellt (nach Buege u. Aust, 1978 und Bus u. Gibson, 1979).



Anmerkung: R = Fettsäurerest

Hydroperoxide sind unstabil; die Reaktion mit Eisen(II)-Ionen führt zur Bildung eines neuen Radikals (Abb. 2 aus: Recknagel u. Glende, 1977).

Abb. 2



Aus dem Abbau der 6-Hydroperoxide der Linolsäure und Arachidonsäure entsteht Pentan (Donovan und Menzel, 1978; Tappel, 1980). Äthan wird durch den Abbau der 3-Hydroperoxide der Linolensäure gebildet (Liebermann und Mapson, 1964; Tappel, 1980).

I.4. Messung der Lipidperoxidation

Die Lipidperoxidation kann in vivo unspezifisch durch den Nachweis der konjugierten Diene bestimmt werden (Bus und Gibson, 1979). Die Diene sind durch eine charakteristische Absorption bei 237 nm gekennzeichnet und durch eine Schulter im Bereich von 260 und 280 nm, die den Ketondienen zuzuordnen ist.

Die am weitesten verbreitete Methode, die Lipidperoxidation zu messen, war bis vor wenigen Jahren der Thiobarbitursäure-Test (TBA-Test). Er basiert auf der Reaktion zwischen Thiobarbitursäure (TBA) und einigen Aldehyden, die als Folgeprodukte der Peroxidationsreaktionen auftreten (Wilbur et al., 1949). Die Absorptionsmaxima liegen bei 450 nm und bei 530 nm. Die Extinktion des entstandenen Farbstoffes bei 530 nm ist für Malondialdehyd und für Produkte, die von Malondialdehyd abstammen, relativ spezifisch (Asakawa u. Matsushita, 1979).

Um die Peroxidationsprodukte quantitativ zu bestimmen, werden Fe^{2+}-Ionen benötigt, die den weiteren Zerfall der Hydroperoxide zu ihren Sekundärprodukten katalysieren.

In den letzten Jahren hat sich die gaschromatographische Messung von Alkanen immer mehr durchgesetzt. Sie hat sich insbesondere für in vivo-Untersuchungen der Lipidperoxidation als aussagekräftige

Methode erwiesen. Erstmals fanden Riely et al. (1974), daß Mäuse nach CCl_4-Behandlung kleine Mengen von Äthan abatmeten. In vitro korrelierte die Äthanmenge mit der Menge an gebildetem Malondialdehyd. Diese Ergebnisse wurden von Hafemann u. Hoekstra (1977) und Köster et. al. (1977) bestätigt.

Die Arbeitsgruppen um Tappel (Dillard et al., 1977 und 1980; Sagai u. Tappel, 1978 und 1979; Gee u. Tappel, 1981; Dumelin und Tappel, 1977) und weitere Autoren (Dougherty u. Hoekstra, 1977; Köster et al., 1977; Frank et al., 1980; Kivits et al., 1981; De Ruiter et al., 1982). konnten nachweisen, daß auch Pentan und andere gasförmige Kohlenwasserstoffe, unter anderem Propan, als Folgeprodukte der Lipidperoxidation gebildet werden.

I.5. Schutzmechanismen

Aus den oben dargestellten Überlegungen geht hervor, daß die Zelle evolutionsgeschichtlich schon frühzeitig Mechanismen entwickeln mußte, die einer Schädigung der Membranstrukturen und damit einer Änderung der zum Leben notwendigen Permeabilitätseigenschaften entgegenwirken. Dabei dürften die Phospholipide des endoplasmatischen Retikulum die empfindlichsten Komponenten der biologischen Systeme für Peroxidationsreaktionen darstellen (Tappel, 1980).

Superoxiddismutase, α-Tocopherol, Glutathion-Peroxidase, ß-Carotin und Katalase sind wesentliche Bestandteile der zellulären Abwehrmechanismen gegen die Bildung freier Radikale an biologischen Strukturen. Die Bedeutung der einzelnen Schutzmechanismen wird jedoch unterschiedlich beurteilt.

I.5.1. Funktion der Superoxiddismutase

Mc Cord et al. (1976), Balevska et al. (1980) und Nohl (1981) vermuten, daß der Superoxiddismutase (SOD) eine besondere regulatorische Rolle zufällt, da sie von allen in Frage kommenden Reaktionen Radikale mit der größten Geschwindigkeitskonstanten umsetzt.

Abb. 3

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2\,H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Die Stabilität des Superoxid-Radikals nimmt in wäßrigen Lösungen mit steigendem pH zu.

Das Gleichgewicht der Reaktion liegt völlig auf der Seite der Bildung von H_2O_2 und O_2. Die Bildungsgeschwindigkeit dieser Dismutationsprodukte durch die SOD ist so schnell, daß eine Limitierung eher durch Diffusion der Substrate an die SOD als durch die Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms erfolgt. Bei den höheren Organismen gibt es 2 Formen der SOD. Die Mn-abhängige SOD wurde bisher nur in den Mitochondrien nachgewiesen (Nohl, 1981). Die Cu-Zn-abhängige SOD ist im Cytosol lokalisiert. Das Cu-Zn-Protein wurde zuerst aus den Erythrocyten isoliert Deshalb wird es auch als Erythrocuprein bezeichnet.

I.5.2. Funktion des α-Tocopherol

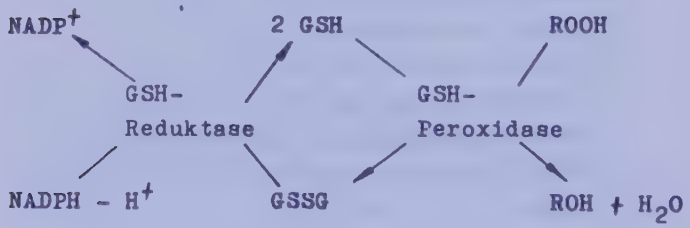
Untersuchungen von Zimmermann et al. (1973), de Duve und Hayaishi (1978) zeigen, daß α-Tocopherol ein sehr wichtiges Antioxidans in den Zellen ist. Dabei fungiert das Vitamin als Radikalfänger für $O_2^{\cdot -}$, $^1O_2$ (de Duve und Hayaishi, 1978) und andere Radikale (Bus und Gibson, 1979). Ein Molekül α-Tocopherol fängt 120 Radikale $O_2^{\cdot -}$ ab (De Duve u. Hayashi, 1978). Die Reduktion des oxidierten Tocopherol ist noch weitgehend unklar. Teilweise soll die Regeneration über eine Konjugierung erfolgen (de Duve, 1978). Neueste Untersuchungen deuten auf eine Beteiligung des Vitamin C an diesem Prozeß hin (Leung et al., 1981). Diese Hypothese wird jedoch von anderen Autoren abgelehnt (Litov et al., 1981).

Ein Mangel an α-Tocopherol äußert sich bei bei der Ratte besonders in einer Schädigung der Leber und der Gonaden (Nair et al., 1978).

I.5.3 Funktion der Glutathion-Peroxidase (GSH-Px)

Andere Autoren, z.B. Anundi et al., (1980), Flohé et al. (1976) vermuten, daß der Hauptgrund für eine gesteigerte Lipidperoxidation die herabgesetzte Aktivität der GSH-Px ist. Die GSH-Px reduziert H_2O_2 unter Bildung von GSSG zu Wasser. Ferner reduziert sie Hydroperoxide ungesättigter Fettsäuren zu Hydroxyfettsäuren (Little und O' Brien, 1968).

Abb. 4 (aus: Sies et al., 1972)



Die höchste Aktivität der GSH-Px wird in der Rattenleber gefunden (Lawrence et al., 1978). Die Funktion des Enzyms ist Selen-abhängig. 1976 wurde eine Non-Selen-GSH-Peroxidase entdeckt (Lawrence und Burk, 1976). Es stellte sich später heraus, daß es sich hierbei um die GSH-S-Transferase B und möglicherweise auch um andere GSH-Trans-

ferase-Formen handelt (Lawrence et al., 1978). Im Gegensatz zur Se-GSH-Px kann die Non-Se-GSH-Px H_2O_2 jedoch nicht reduzieren (Burk und Lawrence, 1978). Hauptsächlich konjugiert jedoch die GSH-S-Transferase Fremdstoffe mit Glutathion. (Pabst et al., 1974; Morgenstern et al., 1981). Dabei entstehen Mercaptursäuren.

Die Lipidperoxidation kann bei Selen- und zusätzlichem Vitamin-E-Mangel noch mehr gesteigert werden. So beobachteten Hafemann und Hoekstra (1977) bei Ratten unter dieser Mangelernährung eine beträchtliche Äthanproduktion in vivo, die mit einer massiven Leberschädigung gut korrelierte.

I.5.4. Bedeutung des Glutathion (GSH)

Als hochspezifisches Substrat der Glutathion-Peroxidase fungiert GSH. Im Stoffwechsel der Zellen übernimmt GSH offensichtlich mehrere Funktionen. Glutathion wird unter Beteiligung der Enzyme Glutamat-Cystein-Dipeptidase und Glutathion-Synthetase intracellulär aus Glutamat, Cystein und Glycin gebildet. Dadurch entsteht eine enge Verbindung zwischen dem Stoffwechsel von GSH und dem Aminosäuretransport. Zum anderen kann aus Glutathion Cystein freigesetzt werden, zumindest dann, wenn Cystein limitierend wird (Tateishi und Higashi, 1978; Wendel, 1980; Wellner und Meister, 1981).

Bisher ist jedoch nicht eindeutig geklärt, wie GSH als hydrophiles Substrat an Reaktionen teilnimmt, die innerhalb der Membranen des endoplasmatischen Reticulum ablaufen. Die Untersuchungen von McCay et al. (1976) deuten darauf hin, daß die Glutathionperoxidase als cytosolisches Enzym nicht ohne weiteres Zugang zu Lipidperoxiden hat, die innerhalb der Zellmembran lokalisiert sind. Tappel (1980) vermutet, daß eine Hydroperoxid-Phospholipase Teil des peroxidierten membrane-repair-Systems sein könnte und daß die Lipase erst die Lipidperoxide für die Reduktion durch GSH-Peroxidase zugänglich macht. Gibson et

al. (1980) nehmen an, daß die Glutathion-Peroxidase ihre Aktivität an den Lipidmembranen erst in Verbindung mit cytosolischem Protein, einem sog. cytosolischen Faktor, entfalten kann.

I.6. Fragestellung

Der Mechanismus der entscheidenden Primärwirkung von Cadmium ist bis heute nicht geklärt . Von mehreren Autoren wird die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß der Basismechanismus für die durch Cadmium- und andere Metallionen hervorgerufene akute Toxizität die Lipidperoxidation sein könnte (Omaye und Tappel, 1975; Gabor et al., 1978; Magos und Webb, 1980). Splitgerber und Tappel (1979) zeigten in in vitro-Versuchen, daß einige Metallionen, darunter auch Cadmiumionen, die selenabhängige Glutathion-Peroxidase der Rattenleber inhibieren. Nach Reddy et al. (1981) werden die Glutathion-Peroxidase- und die GSH-Transferase-Aktivitäten der Kalbsleber durch Cadmium-, Quecksilber- und Bleiionen herabgesetzt.

Andere Untersuchungen deuten auf einen protektiven Effekt des Metallothionein gegenüber hepatotoxischen Substanzen wie CCl_4 hin (Cagen und Klaassen, 1979). Als Ursache hierfür diskutieren die Autoren eine vermehrte Bindung von CCl_4-Metaboliten an Metallothionein.

Die Wirkung von Cadmium auf die Lipidperoxidation ist bisher nur in vitro untersucht worden. So konnten Stacey und Kappus (1982) nachweisen, daß Cadmium in isolierten Hepatocyten-Suspensionen die Lipidperoxidation

nur geringfügig erhöht.

Die erwähnten Beobachtungen bildeten den Ausganspunkt für die vorliegenden Untersuchungen. Im wesentlichen sollte anhand der Alkanbildung festgestellt werden, wie subakute Cadmiumbelastungen die normale und die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation in vivo beeinflussen und welche Faktoren für die beobachteten Effekte verantwortlich sein könnten. Auf dem Hintergrund der von Stacey und Klaassen (1980 und 1981) durchgeführten in vitro-Studien über den Einfluß von Cadmium auf die Äthanproduktion sollte geprüft werden, ob unter Cadmiumbelastung in vivo eine Lipidperoxidation stattfindet. Unser besonderes Interesse galt dabei der Messung des Glutathiongehaltes in der Leber.

Die ursprüngliche Vermutung, nach der Cadmium die Lipidperoxidation stimuliert, hat sich jedoch in unseren in vivo-Experimenten nicht bestätigen lassen. Um weiteren Aufschluß über die grundlegenden Wirkungsbedingungen von Cadmium auf die Lipidperoxidation zu bekommen, haben wir daher Cadmium-

thionein und Cytochrom P-450 bestimmt. Wir erhofften uns dadurch, die Bedeutung dieser Proteine für den Einfluß von Cadmium auf die Lipidperoxidation näher definieren zu können. Aus der Summe dieser Befunde und der Fülle der aus der Literatur bekannten Einzelergebnisse wird versucht, ein Bild des möglichen Wirkungsmechanismus von Cadmium auf die Lipidperoxidation abzuleiten.

II. Material und Methodik

II.1. Chemikalien

Atemkalk (Korngröße 3 - 5 mm, mit Äthylenviolett als Indikator)	Fa. ICI-Pharma, Plankstadt
Cadmiumchlorid ($CdCl_2$)	Fa. Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Fa. Merck
Kochsalz (NaCl)	Fa. Merck
Liquemin^R (Heparin)	Fa. Hoffmann-La Roche
Natriumdithionit ($Na_2S_2O_4$)	Fa. Merck
reduziertes Nikotinamid-adenindinukleotid (NADH)	Fa. Boehringer
Olivenöl "Dante"	Fa. Giacomo Costa Fu Andrea, Genova
Renex	Fa. Caesar & Loretz, Hilden

Sörensen-Phosphatpuffer, pH 7,5; aus	
prim. Kaliumphosphat (KH_2PO_4) und	Fa. Merck
sek. Natriumphophat (Na_2HPO_4)	Fa. Merck
Standardfutter	Fa. Höveler, Langenfeld
Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4)	Fa. Merck
Urethan	Fa. Riedel-De Haen Hannover

Gase

Stickstoff	Fa. Linde
Wasserstoff	Fa. Linde
Luft	Fa. Linde

Eichgasgemisch siehe Abschnitt II.3.1

II.2. Vorbehandlung der Tiere

Die Untersuchungen wurden an männlichen Albinoratten (Tierversuchsanlage der medizinischen Einrichtungen, Universität Düsseldorf, Stamm Wistar) mit einem Körpergewicht von 200 bis 280 g durchgeführt. Die Tiere wurden einzeln in Makrolonkäfigen bei einer konstanten Raumtemperatur von 23 ° C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Eine Versuchsreihe (belastete Ratten und entsprechende Kontrollratte im Parallelversuch) setzte sich aus 4 - 5 Tieren zusammen. An drei aufeinander folgenden Tagen wurde den Tieren um die gleiche Uhrzeit $CdCl_2$ in verschiedenen Konzentrationen und den Kontrolltieren isotone Kochsalzlösung subcutan injiziert. 18 Stunden vor Beginn der Messung wurde den Tieren das Standardfutter (Fa. Höveler, Langenfeld) entzogen. Wasser erhielten sie weiterhin ad libitum.

Am 4. Tag, 18 Stunden nach der letzten Cd-Applikation, wurde den Tieren CCl_4, gelöst in reinem Olivenöl, in einer Dosis von 1g/kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Die Lösung (1g CCl_4 auf 10 ml Olivenöl) wurde kurz vor der intraperitonealen Applikation angesetzt.

Die Tiere wurden dann einzeln in 2700 ml Exsikkatoren aus Glas gesetzt, und ausgeatmetes Äthan, Propan und Pentan gaschromatographisch analysiert.

II.3 Labortechnische Untersuchungen

II.3.1 Messung der Alkanproduktion

Für die Bestimmung der Äthan-, Propan- und Pentanexhalation benutzten wir eine selbstkonstruierte Apparatur (Abb. 5). Jeweils ein Exsikkator war mit einem Sauerstoffspirometer über eine Waschflasche verbunden, die destilliertes Wasser enthielt. Um Spuren von Äthan und anderen Kohlenwasserstoffen in der Laborluft zu beseitigen, wurde der Exsikkator vor Beginn der Messungen 5 Minuten mit reinem Sauerstoff durchgespült. Wie aus der Abbildung 5 hervorgeht, konnte der Sauerstoffverbrauch in diesem System nur summarisch gemessen werden. Ein von außen angetriebener Magnetstab im Inneren des Exsiccators sorgte für die gleichmäßige Verteilung der ausgeatmeten Gase. CO_2 wurde von Atemkalk absorbiert und ständig durch Sauerstoff aus dem Spirometersystem ersetzt. Je Exsikkator wurden 150 g Atemkalk eingewogen.

Die Konzentrationen von Äthan, Propan und Pentan im Exsikkator wurden bestimmt, indem zu verschiedenen Zeiten, spätestens jedoch 6 Stunden nach der CCl_4-Injektion Gasproben entnommen und gaschromatographisch analysiert wurden. Die gefundenen Werte wurden dann auf 1 kg Körpergewicht bezogen.

Methan konnte nicht quantitativ bestimmt werden, weil es sich mit dem Sauerstoff-peak der Gasproben überlagerte.

Für die Analyse wurde der Gaschromatograph Modell 427 der Firma Hewlett-Packard mit einem Flammenionisationsdetektor benutzt. Wir arbeiteten mit einer 3 m langen Stahlsäule, Durchmesser 1,5 mm. Als Packmaterial wurde Aluminiumoxid, mesh 80/100, verwendet. Die flow rate des Trägergases (N_2) betrug 30 ml/min, des Wasserstoffes 35 ml/min und der Luft 300 ml/min.

Die Säule hatte eine Anfangstemperatur von 70 °C, die nach 3 Minuten um 20 °C/min bis auf 140°C anstieg. Die Temperatur des Detektors wurde auf 270°C gehalten. In einer 10 ml Spritze wurden Gasproben aus dem Exsikkator über ein Septum mit einer G 14-Braunüle entnommen und mit Ausnahme des 6-Stundenwerts sofort über eine 5 ml-Schleife auf die Säule gebracht.

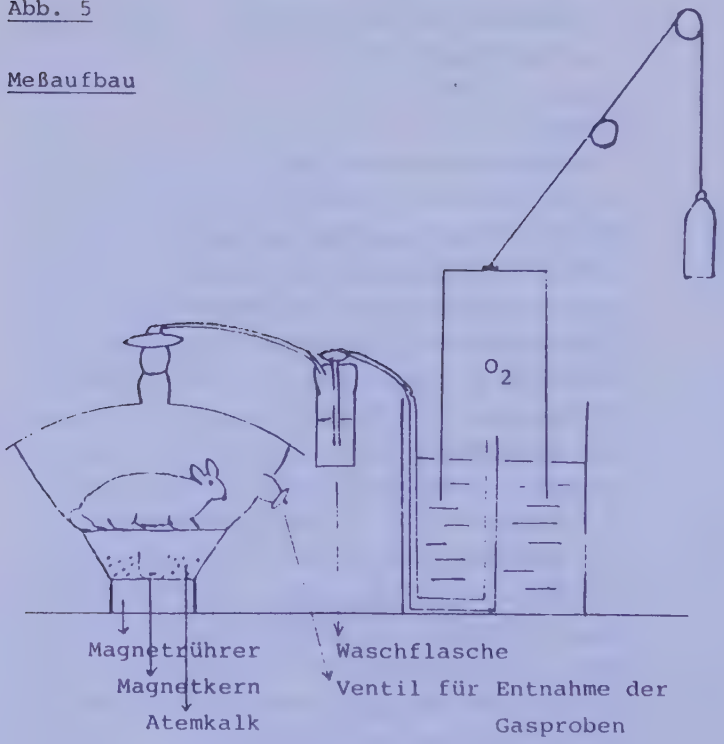
Das Elektrometer wurde auf höchste Empfindlichkeit eingestellt (1×10^{-12} Volt). Die Signale wurden mit Hilfe eines Integrators, 3380 A Hewlett Packard, registriert und automatisch vermessen (Einstellung: attenuation 1, slope sensitivity 0,3 m V/min, chart speed 0,5 cm/min)

Als Eichgase dienten Kohlenwassergemische der Fa. Messer Griesheim:

CH_4	Methan	9,9 vpm
C_2H_6	Äthan	9,8 vpm
C_3H_8	Propan	14,8 vpm
$n\text{-}C_4H_{10}$	n-Butan	10,0 vpm
$i\text{-}C_4H_{10}$	i-Butan	9,3 vpm
N_2	Stickstoff	Rest

Abb. 5

Meßaufbau



Abk.: O_2 = Sauerstoff

II.3.2 Messung von Cytochrom P-450

6 Stunden nach Beginn der Alkanmessungen wurden die Tiere mit 1,25 g Urethan/kg Körpergewicht narkotisiert. Um die Bildung von Thromben während der anschließenden chirurgischen Intervention zu verhindern, wurden 200 E Heparin auf 1 ml 25%ige Urethan-Lösung hinzugegeben. Die Bauchhöhle wurde dann eröffnet, und die Leber mit eiskalter isotoner Kochsalzlösung hämoglobinfrei perfundiert. Die Leber wurde danach entnommen, zerkleinert und mit dem Glas-Teflon-Potter-Elvehjem Homogenisator (Fa. Braun-Melsungen) im vierfachen Volumen eiskalter 1,15 %iger KCl, pH 7,4 homogenisiert (6 x/1,5 min).

Nach Verdünnung in Phosphatpuffer nach Sörensen erfolgte die Bestimmung von Cytochrom P-450. Die Messung beruht auf dem Prinzip, daß Cytochrom P-450 mit CO reagiert und durch Natriumdithionit ($Na_2 S_2 O_4$) sehr schnell reduziert wird. Um den störenden Einfluß des Cytochrom b_5 (das kein Kohlenmonoxid bindet) auszuschalten, wurde in die Vergleichsküvette NADH gegeben. Entsprechend der Methode nach Greim (1970) wurde das Homogenat nach Verdünnung mit dem Sörensen-Phosphatpuffer und Zugabe von Renex durch Pasteurpipetten, die etwas mit Watte gestopft waren, zuerst gefiltert. Das Filtrat wurde

dann auf 2 Küvetten verteilt und jeweils 30 Sekunden lang mit CO begast. Nach Reduktion des Meßküvetteninhalts mit $Na_2S_2O_4$ und des Inhalts der Kontrollküvette mit NADH wurde das Kohlenmonoxid-Differenzspektrum im Perkin Elmer 555 Spektrophotometer zwischen 490 und 450 nm aufgenommen. Der Extinktionskoeffizient für Cytochrom P-450 ist $\Delta\varepsilon_{450-490} = 91\ (mmol/l)^{-1}\ cm^{-1}$.

II.4. Versuchsplanung

II.4.1. Einteilung der Versuche

Die Untersuchungen wurden in zwölf Hauptversuchsgruppen aufgegliedert. Zunächst wurde die Alkanexhalation bei gefasteten und ad libitum gefütterten Ratten gemessen, jeweils ohne und nach CCl_4-Applikation. Aufgrund der erheblichen Varianz der CCl_4-stimulierten Äthan- und Pentanfreisetzung bei den gefütterten Tieren gingen wir dazu über, in allen darauffolgenden Versuchen die Tiere 18 Stunden vor Beginn der Alkanmessungen fasten zu lassen. In der nächsten Versuchsreihe wurde die Wirkung von Cadmium bei gefasteten Ratten bestimmt. Da die Alkanmessungen unter diesen Bedingungen im Bereich der unteren Nachweisgrenze lagen, ließ sich die Wirkung von Cadmium-Ionen nicht bzw. nur unvollkommen darstellen. Aus diesen meßmethodischen Gründen wurde die Wirkung von Cadmium auf die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation dargestellt. In abschließenden Versuchen wurde die Dosisabhängigkeit von Cadmium auf die CCl_4-stimulierte Alkanexhaltation aufgezeigt. Dabei wurde den Tieren bis zu 3,0 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht verabreicht. Auf eine höhere Dosis wurde verzichtet, da die LD_{50}, intraperitoneal injiziert, mit 3,48 - 5,5 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht bei Ratten angegeben wird (Samarawickrama, 1979).

Nach endgültiger Festsetzung der Versuchsbedingungen wurde zusätzlich der Cytochrom P-450-Gehalt in den Leberhomogenaten gemessen. Daher ist für die Bestimmung von Cytochrom P-450 eine niedrigere Anzahl der Versuchstiere vorhanden. Parallel dazu wurde in den Leberhomogenaten derselben Tiere auch der GSH-Gehalt und der Gesamtgehalt an säurelöslichen Thiolgruppen gemessen. Außerdem wurde die Thioneininduktion in der Leber in Abhängigkeit von der Cadmium-Dosis verfolgt. Aus zeitlichen Gründen wurden diese Untersuchungen von Dr. Menzel durchgeführt.

II.4.2 Zusammenstellung der Versuchsgruppen

Vorbehandlung der Tiere	Anzahl
Versuchsgruppe 1 Standardfutter und Wasser ad libitum. An drei aufeinanderfolgenden Tagen 10 ml 0,9 %ige NaCl/kg Körpergewicht s.c. verabreicht. I.p.-Injektion von Olivenöl (10 ml/kg Körpergewicht) 10 Minuten vor Versuchsbeginn. Abk.: NaCl-Öl, ad libitum.	3
Versuchsgruppe 2 Nahrungsentzug 18 Stunden vor Versuchsbeginn. Wasser ad libitum. An drei aufeinanderfolgenden Tagen 10 ml 0,9 %ige NaCl/kg Körpergewicht s.c. verabreicht. I.p.-Injektion von Olivenöl (10 ml/kg Körpergewicht) 10 Minuten vor Versuchsbeginn. Abk.: NaCl-Öl, gefastet.	6
Versuchsgruppe 3 Haltung bei Standardkost und Wasser ad libitium. An drei aufeinanderfolgenden Tagen 10 ml/kg Körpergewicht 0,9 %ige NaCl s.c. appliziert. I.p.-Injektion von CCl_4 (1g/kg Körpergewicht in Olivenöl) 10 Minuten vor Versuchsbeginn. Abk.: NaCl-CCl_4, ad libitum	8

Vorbehandlung der Tiere	Anzahl
Versuchsgruppe 4 Nahrungsentzug 18 Stunden vor Versuchsbeginn. Wasser ad libitum. An drei aufeinanderfolgenden Tagen 10 ml 0,9 % ige NaCl/kg Körpergewicht s.c. verabreicht. I.p.-Injektion von CCl_4 10 Minuten vor Versuchsbeginn. Abk.: NaCl-CCl_4, gefastet	13
Versuchsgruppe 5 Nahrungsentzug 18 Stunden vor Versuchsbeginn. Wasser ad libitum. An drei aufeinanderfolgenden Tagen 0,5 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht s.c. verabreicht. I.p.-Injektion von Olivenöl kurz vor Versuchsbeginn. Abk.: Cd-Öl, 3 x 0,5 mg Cd, gefastet	3
Versuchsgruppe 6 Nahrungsentzug 18 Stunden vor Versuchsbeginn. Wasser ad libitum. An drei aufeinanderfolgenden Tagen 1,0 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht s.c. verabreicht. I.p.-Injektion von Olivenöl kurz vor Versuchsbeginn. Abk.: Cd-Öl, 3 x 1,0 mg Cd, gefastet	3

Vorbehandlung der Tiere	Anzahl
Versuchsgruppe 7 Nahrungsentzug 18 Stunden vor Versuchsbeginn. Wasser ad libitum. An drei aufeinanderfolgenden Tagen 2,0 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht s.c. verabreicht. I.p.-Injektion von Olivenöl kurz vor Versuchsbeginn. Abk.: Cd-Öl, 3 x 2,0 mg Cd, gefastet	6
Versuchsgruppe 8 Nahrungsentzug 18 Stunden vor Versuchsbeginn. Wasser ad libitum. An drei aufeinanderfolgenden Tagen 3,0 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht s.c. verabreicht. I.p.-Injektion von Olivenöl kurz vor Versuchsbeginn. Abk.: Cd-Öl, 3 x 3,0 mg Cd, gefastet	3
Versuchsgruppe 9 Nahrungsentzug 18 Stunden vor Versuchsbeginn. Wasser ad libitum. An drei aufeinanderfolgenden Tagen 0,5 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht s.c. verabreicht. I.p.-Injektion von CCl_4 10 Minuten vor Versuchsbeginn. Abk.: Cd-CCl_4, 3 x 0,5 mg Cd, gefastet	7

Vorbehandlung der Tiere	Anzahl
Versuchsgruppe 10 Nahrungsentzug 18 Stunden vor Versuchsbeginn. Wasser ad libitum. An drei aufeinanderfolgenden Tagen 1,0 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht s.c. verabreicht. I.p.-Injektion von CCl_4 10 Minuten vor Versuchsbeginn. Abk.: Cd-CCl_4, 3 x 1,0 mg Cd, gefastet	2
Versuchsgruppe 11 Nahrungsentzug 18 Stunden vor Versuchsbeginn. Wasser ad libitum. An drei aufeinanderfolgenden Tagen 2,0 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht s.c. verabreicht. I.p.-Injektion von CCl_4 10 Minuten vor Versuchsbeginn. Abk.: Cd-CCl_4, 3 x 2,0 mg Cd, gefastet	11
Versuchsgruppe 12 Nahrungsentzug 18 Stunden vor Versuchsbeginn. Wasser ad libitum. An drei aufeinanderfolgenden Tagen 3,0 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht s.c. verabreicht. I.p.-Injektion von CCl_4 10 Minuten vor Versuchsbeginn. Abk.: Cd-CCl_4, 3 x 3,0 mg Cd, gefastet	3

Abk.: s.c. = subkutan
i.p. = intraperitoneal

II.5. Statistische Auswertung

Die Abbildungen enthalten Angaben des Mittelwertes ($\bar{x}$) und dessen Standardabweichung (s_x). Die Ergebnisse wurden mit dem t-Test nach Student für kleine Stichproben beurteilt. Als Signifikanzkriterium wurde $p < 0,05$ gewählt. Die Berechnungen erfolgten mit einem Hewlett-Packard Calculator 7021 a.

III. Ergebnisse

III.1. Alkanproduktion

III.1.1 Alkanproduktion bei unbehandelten Ratten (Tab. 1 und Abb. 6)

In Versuchen mit männlichen Ratten, die weder mit Cd^{2+} noch mit CCl_4 vorbehandelt wurden, wurde zunächst der Einfluß der Nahrungsaufnahme auf die Alkanproduktion untersucht.

Die Untersuchungen waren durch den Umstand erschwert, daß die Exhalation von Propan und Pentan teilweise zu gering war, um mit dieser Methode meßbar zu werden. Die Propan- und Pentanexhalation lag bei den nicht mit CCl_4 behandelten Tieren nach Nahrungsentzug unter 3 nmol/kg Körpergewicht und erreichte nach ausreichender Nahrungszufuhr Werte zwischen 2,3 und 4,3 nmol/kg für Propan sowie zwischen 0,5 und 5,5 nmol/kg für Pentan in 6 Stunden. Ein signifikanter Unterschied ergab sich nicht. Die Äthanproduktion war mit ca. 10 nmol/kg Körpergewicht x 6 Stunden deutlich höher und wurde von der Nahrungsaufnahme nicht beeinflußt.

Tabelle 1

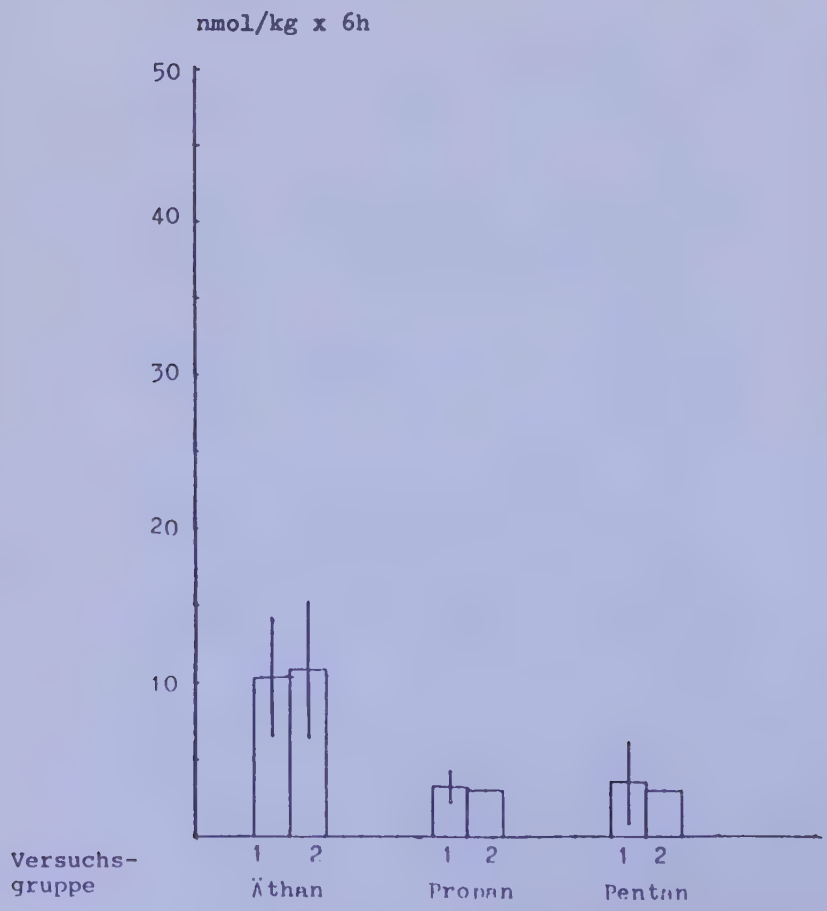
Äthan-, Propan- und Pentanexhaltation bei gefütterten und gefasteten Ratten im Verlauf von 6 Stunden nach Applikation von Olivenöl. Angabe in nmol/kg Körpergewicht x 6 h (Stunden). Den Tieren wurde vorher an drei aufeinanderfolgenden Tagen isotone Kochsalzlösung injiziert. Ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich nicht.

$\bar{x}$ = Mittelwert
s_x = Standardabweichung

Vorbehandlung der Tiere	Tierzahl	Äthan $\bar{x} \pm s_x$	Propan $\bar{x} \pm s_x$	Pentan $\bar{x} \pm s_x$
NaCl-Öl, ad libitum = Versuchsgruppe 1	3	$10,3 \pm 3,8$	$3,2 \pm 1,0$	$3,5 \pm 2,6$
NaCl-Öl, gefastet = Versuchsgruppe 2	6	$10,8 \pm 4,4$	< 3	< 3

Abb. 6

Alkanexhalation bei gefütterten (= Versuchsgruppe 1) und gefasteten (= Versuchsgruppe 2) Ratten im Verlauf von 6 Stunden nach Applikation von Olivenöl. Angabe in nmol/kg Körpergewicht x 6 Stunden. Den Tieren wurde vorher an drei aufeinanderfolgenden Tagen isotone Kochsalzlösung injiziert.



III.1.2 Alkanproduktion nach Stimulation der Lipidperoxidation mit CCl_4 (Tab. 2 und Abb. 7)

Die nach CCl_4-Applikation beobachtete Erhöhung der Alkan-Exhalation war bei den gefütterten Tieren wesentlich stärker ausgeprägt als bei den gefasteten Tieren.

Die Erhöhung bezog sich auf alle drei gemessenen Kohlenwasserstoffe. Dabei atmeten die gefütterten Tiere sehr unterschiedliche Mengen der Alkane aus. Auffällig war die große Streubreite bei Äthan und Pentan. Eine 18-stündige Hungerperiode hemmte die CCl_4-induzierte Alkanproduktion; eine signifikante Reduzierung auf 33 % bzw. 10 % des Ausgangswertes (= Versuchsgruppe 3) konnte nur für Äthan und Pentan, aber nicht für Propan ermittelt werden.

Tab. 2

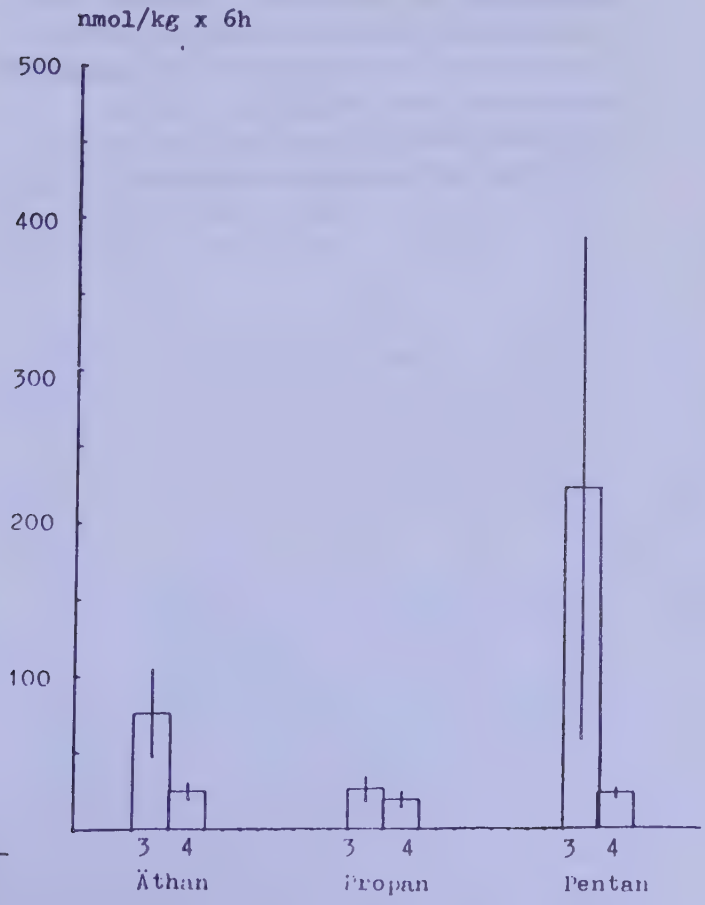
CCl_4-stimulierte Äthan-, Propan- und Pentanexhalation
bei gefütterten und gefasteten Ratten im Verlauf von 6 Stunden
nach Applikation von CCl_4. Angabe in nmol/kg Körpergewicht x 6 Stunden.
Den Tieren wurde vorher an drei aufeinanderfolgenden Tagen
isotone Kochsalzlösung injiziert.

$\bar{x}$ = Mittelwert
s_x = Standardabweichung
p = Signifikanzniveau
n.s. = nicht signifikant

Versuchs-gruppe	Vorbehandlung	Tier-zahl	Äthan $\bar{x} \pm s_x$	%	Propan $\bar{x} \pm s_x$	%	Pentan $\bar{x} \pm s_x$	%
3	NaCl-CCl_4 ad libitum	8	76,3±28,4	100	26,5±7,9	100	222,7±164,0	100
4	NaCl-CCl_4 gefastet	13	25,4±5,5	33	19,5±4,8	73,6	23,2±3,3	10,4
			$p \leq 0{,}001$		p = n.s.		$p \leq 0{,}001$	

Abb. 7

CCl_4-stimulierte Alkanexhaltation bei gefütterten (= Versuchsgruppe 3) und gefasteten Tieren (Versuchsgruppe 4) im Verlauf von 6 Stunden nach Applikation von CCl_4. Angabe in nmol/kg Körpergewicht x 6 h. Den Tieren wurde vorher an drei aufeinanderliegenden Tagen isotone Kochsalzlösung injiziert.



III.1.3 Alkanproduktion nach Cadmium-Exposition (Tab. 3 und Abb. 8)

Die Alkanproduktion nahm in Abhängigkeit von der Cd^{2+}-Dosis kontinuierlich ab. Der Hemmeffekt war jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als bei den CCl_4-vorbehandelten Ratten. Die Äthankonzentrationen bewegten sich teilweise im Bereich der unteren Nachweisgrenze. Dennoch ließ sich die Dosisabhängigkeit für Äthan unter diesen Bedingungen noch darstellen (Abb. 8). Bei Propan und Pentan ist hingegen die Produktion normalerweise schon so gering, daß die Wirkung von Cadmium-Ionen auf diese Weise nicht mehr bestimmt werden konnte.

Tab. 3

Äthanexhalation in Abhängigkeit von der Cadmium-Dosis, angegeben in nmol/kg Körpergewicht x 6 h. Keine CCl_4-Applikation. Die Bestimmung erfolgte 6 Stunden nach Applikation von Olivenöl. Den Tieren wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen Cd^{2+} in verschiedenen Dosen bzw. isotone NaCl-Lösung verabreicht. Nahrungsentzug 18 Stunden vor Versuchsbeginn. Die Propan- und Pentanwerte dieser Versuchsreihe lagen um 3 nmol/kg Körpergewicht bzw. waren nicht meßbar.

$\bar{x}$ = Mittelwert
s_x = Standardabweichung
p = Signifikanzniveau
n.s. = nicht signifikant

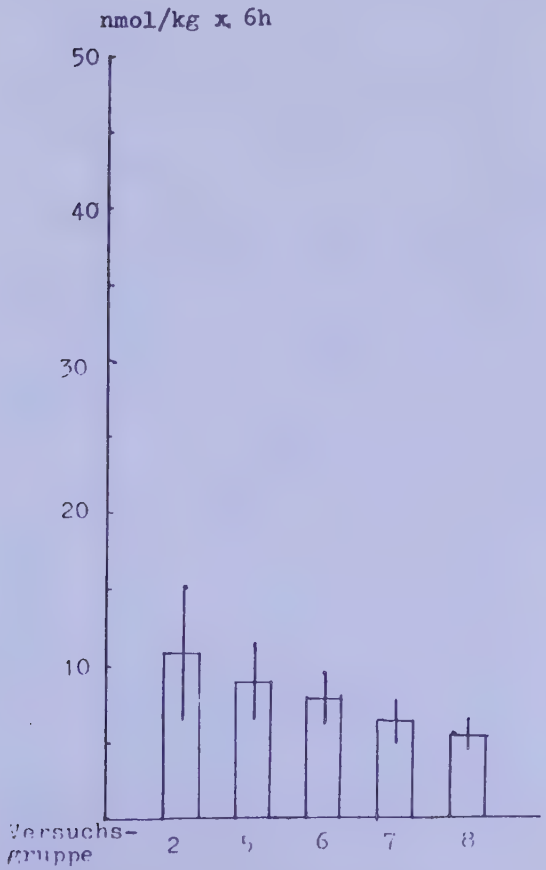
Versuchsgruppe	Vorbehandlung	Äthan $\bar{x} \pm s_x$	Anzahl	P	%
2	NaCl-Öl, gefastet	$10,8 \pm 4,4$	6		100%
				n.s.	
5	Cd-Öl, 3 x 0,5 mg Cd gefastet	$8,9 \pm 2,4$	3		82,4%

Fortsetzung Tab. 3

Versuchs-gruppe	Vorbehandlung der Tiere	Äthan $\bar{x} \pm s_x$	Anzahl	P	%
2	NaCl-Öl, gefastet	$10,8 \pm 4,4$	6		100%
				n.s.	
6	Cd-Öl, 3 x 1,0 mg Cd, gefastet	$7,8 \pm 1,7$	3		72,2%
2	NaCl-Öl, gefastet	$10,8 \pm 4,4$	6		100%
				$<0,05$	
7	Cd-Öl, 3 x 2,0 mg Cd, gefastet	$6,3 \pm 1,4$	6		58,3%
2	NaCl-Öl, gefastet	$10,8 \pm 4,4$	6		100%
				n.s.	
8	Cd-Öl, 3 x 3,0 mg Cd, gefastet	$5,4 \pm 1,0$	3		50,0%

Abb.8

Äthanexhalation in Abhängigkeit von der Cadmium-Dosis, angegeben in nmol/kg Körpergewicht x 6 h; keine CCl_4-Applikation. Die Bestimmung erfolgte 6 Stunden nach Applikation von Olivenöl. Den Tieren wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen Cd^{2+} in verschiedenen Dosen bzw. isotone NaCl-Lösung verabreicht. Nahrungsentzug 18 Stunden vor Versuchsbeginn.



III.1.4 Alkanproduktion nach Cadmium- und CCl_4-Exposition (Tab. 4 und Abb. 9)

Die nach Cd^{2+}-Injektion beobachtete Hemmung der Alkanexhalation kam nach zusätzlicher Vorbehandlung der Tiere mit CCl_4 deutlich zum Ausdruck. Eine Dosis von 3 x 0,5 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht unterdrückte die CCl_4-stimulierte Lipidperoxidation nur geringfügig. Bei einer Dosis von 3 x 1,0 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht nahm sie auf ca. 70 %, bei 3 x 2,0 mg Cd^{2+} auf ca. 60 % und bei 3 x 3,0 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht auf ca. 50 % des Ausgangswertes (Versuchsgruppe 4) ab. Ein signifikanter Unterschied in der Alkanexhalation konnte infolge der teilweise geringen Tierzahlen nur zwischen der mit 2 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht behandelten Versuchsgruppe (Nr. 11) und der entsprechenden Kontrolle (Versuchsgruppe 4) bestimmt werden. Er betrug für Äthan und Pentan $P < 0,001$ und für Propan $P < 0,01$. In dieser Versuchsanordung nahm die Exhalation von Äthan nach Cadmium-Exposition auf 59 %, Propan auf 61 % und Pentan auf 68 % ab.

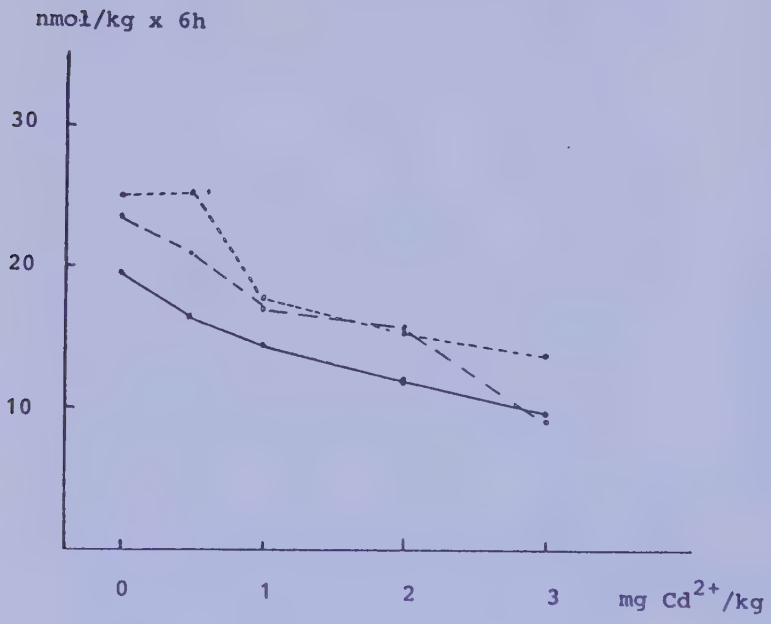
Äthan-, Propan- und Pentanexhalation bei gefasteten Ratten in Abhängigkeit von der Cadmium-Dosis, angegeben in nmol/kg Körpergewicht x 6 Stunden. Die Bestimmung erfolgte 6 Stunden nach CCl_4-Applikation.

$\bar{x}$ = Mittelwert
s_x = Standardabweichung
p = Signifikanzniveau
n.s. = nicht signifikant

Versuchs-gruppe	Vorbehandlung der Tiere	An-zahl	Äthan $\bar{x} \pm s_x$	p	%	Propan $\bar{x} \pm s_x$	p	%	Pentan $\bar{x} \pm s_x$	p	%
4	$NaCl-CCl_4$, gefastet	13	$25,4 \pm 5,5$		100	$19,5 \pm 4,8$		100	$23,2 \pm 3,3$		100
				n.s.			n.s.			n.s.	
9	$Cd-CCl_4$, 3 x 0,5 mg Cd^{2+}	7	$25,6 \pm 8,0$		100	$16,5 \pm 3,7$		85	$21,0 \pm 5,3$		91
4	$NaCl-CCl_4$, gefastet	13	$25,4 \pm 5,5$		100	$19,5 \pm 4,8$		100	$23,2 \pm 3,3$		100
				0,1			n.s.			0,05	
10	$Cd-CCl_4$, 3 x 1,0 mg Cd^{2+}	2	$17,8 \pm 1,8$		69	$14,2 \pm 0,9$		73	$16,9 \pm 5,4$		73
4	$NaCl-CCl_4$, gefastet	13	$25,4 \pm 5,5$		100	$19,5 \pm 4,8$		100	$23,2 \pm 3,3$		100
				0,001			0,01			0,001	
11	$Cd-CCl_4$, 3 x 2,0 mg Cd^{2+}	11	$14,9 \pm 3,7$		59	$11,9 \pm 4,1$		61	$15,7 \pm 3,4$		68
4	$NaCl-CCl_4$, gefastet	13	$25,4 \pm 5,5$		100	$19,5 \pm 4,8$		100	$23,2 \pm 3,3$		100
				0,01			0,01			0,001	
12	$Cd-CCl_4$, 3 x 3,0 mg Cd^{2+}	3	$13,4 \pm 3,0$		53	$9,3 \pm 4,4$		48	$9,1 \pm 3,7$		39

Abb. 9

Äthan-, Propan- und Pentanexhalation in Abhängigkeit von der Cadmium-Dosis, 6 Stunden nach CCl_4-Applikation



III.2. Cytochrom P-450

III.2.1. Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber bei unbehandelten Ratten (Tab. 5 und Abb. 10)

Die Werte für den Cytochrom P-450-Gehalt der Leber stimmten bei den gefasteten und gefütterten, nur mit isotoner NaCl-Lösung und mit Olivenöl behandelten Ratten (Versuchsgruppe 1 und 2) annähernd überein (49,9 bzw. 53,0 nmol/g Leber). Die gemessenen geringen Unterschiede lagen im Bereich der Streuung.

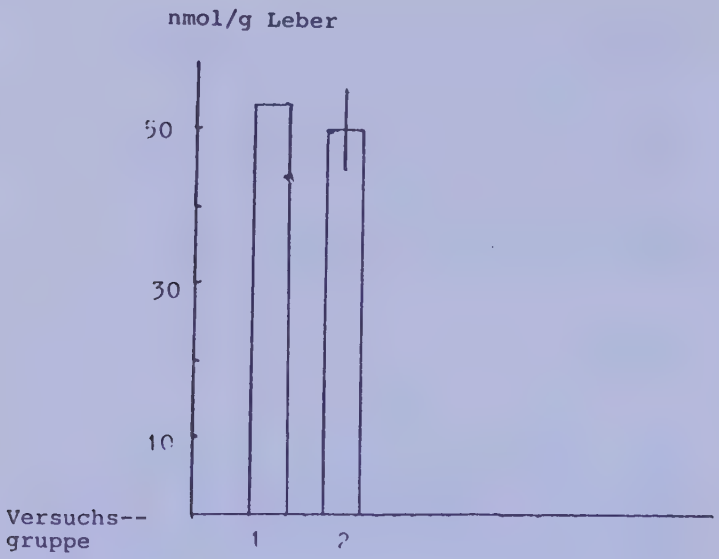
Tabelle 5

Cytochrom-P-450-Gehalt in der Leber, angegeben in nmol/g Leber bei ad libitum gefütterten und gefasteten Ratten. Den Tieren wurde vorher an drei aufeinanderfolgenden Tagen isotone Kochsalzlösung verabreicht.

Versuchsgruppe	Vorbehandlung der Tiere	Anzahl	Cytochrom P_{450} $\bar{x} \pm s_x$
1	NaCl-Öl, ad libitum	1	53,0
2	NaCl-Öl, gefastet	5	$49,9 \pm 5,2$

Abb. 10

Text siehe Tabelle 5



III.2.2 Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber nach CCl_4-Applikation (Tab. 6 und Abb. 11)

Auch der nach CCl_4-Applikation beobachtete Abfall des Cytochrom-P-450-Gehaltes in der Leber zeigte zwischen ad libitum gefütterten und gefasteten Tieren keinen wesentlichen Unterschied. Die Cytochrom-P-450-Konzentration in der Leber verringerte sich bei den gefasteten Tieren nach CCl_4-Injektion auf 40,3 % der entsprechenden Kontrollgruppe (Versuchsgruppe 2). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei den gefütterten Tieren gefunden (Versuchsgruppe 3, Kontrollgruppe 1).

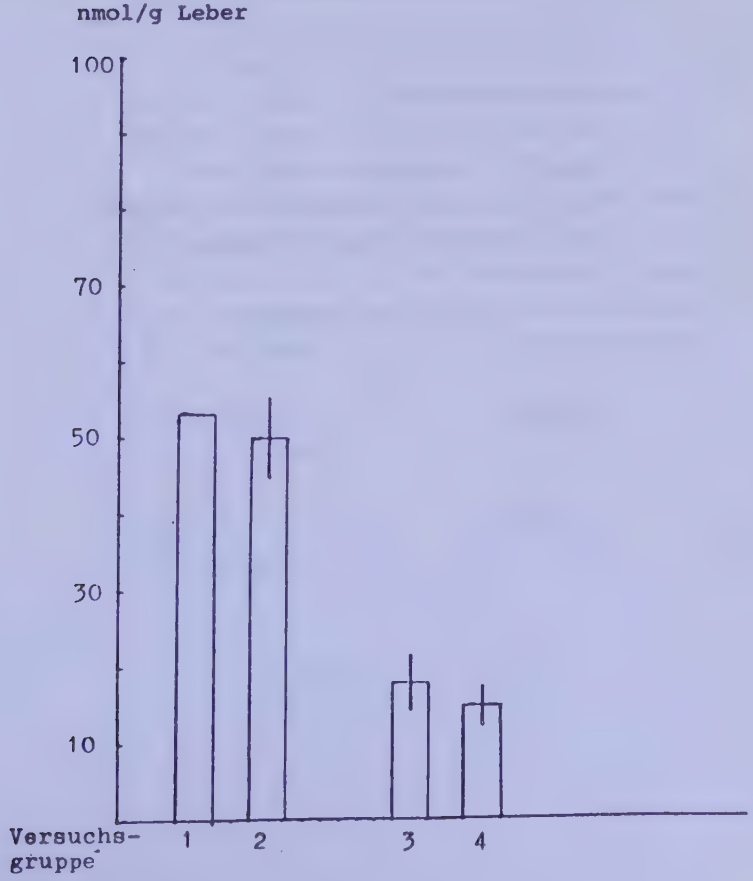
Tabelle 6

Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber bei ad libitum gefütterten und gefasteten Tieren, 6 Stunden nach CCl_4-Applikation. Angabe in nmol/g Leber x 6 h. Den Tieren wurde vorher an drei aufeinanderfolgenden Tagen isotone Kochsalzlösung verabreicht.

Versuchs-gruppe	Vorbehandlung der Tiere	Anzahl	Cytochrom P-450 $\bar{x} \pm s_x$
3	NaCl-CCl_4, ad libitum	7	$17,8 \pm 3,5$
4	NaCl-CCl_4, gefastet	9	$14,7 \pm 2,5$
1	NaCl-Öl, ad libitum	1	53,0
2	NaCl-Öl, gefastet	5	$49,9 \pm 5,2$

Abb. 11

Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber bei ad libitum gefütterten (Versuchsgruppe 3) und gefasteten Tieren (Versuchsgruppe 4), 6 Stunden nach CCl_4-Applikation. Angabe in nmol/g Leber x 6 h. Den Tieren wurde vorher an drei aufeinanderfolgenden Tagen isotone Kochsalzlösung verabreicht. Kontrollen ohne CCl_4-Behandlung (Versuchsgruppe 1 bzw. 2).



III.2.3 Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber nach Cadmium-Exposition (Tab. 7 und Abb. 12)

Die Wirkung von Cd^{2+} auf den Cytochrom-P-450-Gehalt der Leber konnte besonders deutlich bei den nicht mit CCl_4 behandelten Tieren gezeigt werden. Obwohl bei einer Cd^{2+}-Dosis von 3 x 0,5 mg/kg Körpergewicht die Alkanproduktion nicht signifikant verändert wurde, reichte diese Dosierung aus, um einen Abfall des Cytochrom-P-450-Gehaltes auf 75 % hervorzurufen. Eine Dosis von 3 x 1,0 mg Cd^{2+}/kg reduzierte den Cytochrom-P-450-Gehalt auf knapp 70 %, 3 x 2 mg Cd^{2+}/kg auf etwa 60 % und 3 x 3,0 mg Cd^{2+}/kg Körpergewicht auf etwas über 40 %. Somit zeigte der Cytochrom-P-450-Gehalt nach Cd^{2+}-Applikation im wesentlichen eine gute Relation zu den quantitativen Änderungen des Alkanstoffwechsels.

Tabelle 7

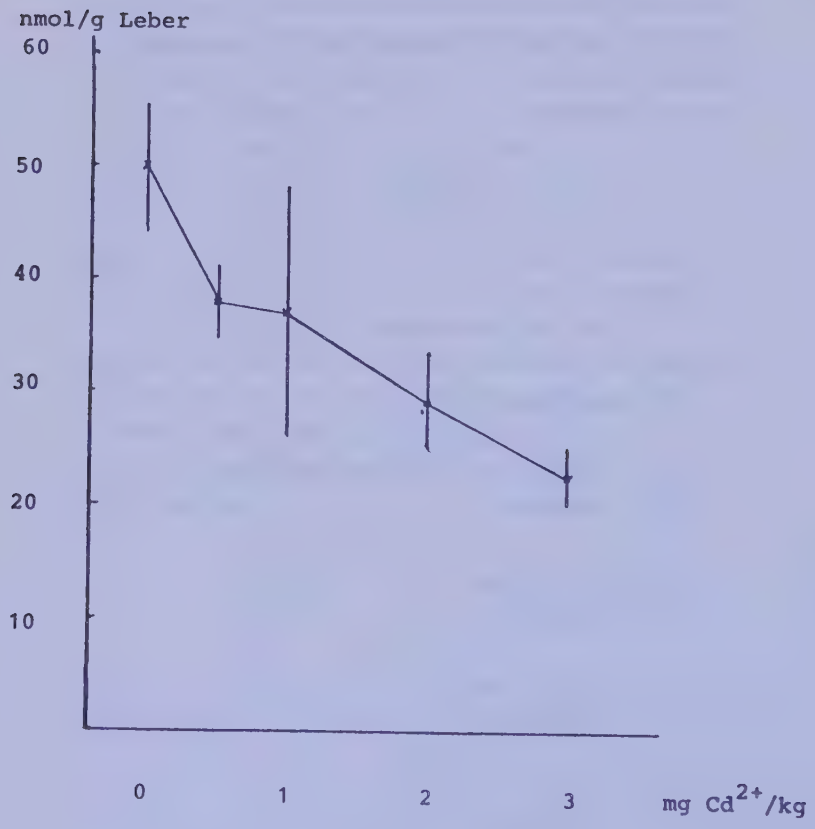
Cytochrom-P-450-Gehalt in der Leber in Abhängigkeit von der Cadmium-Dosis, angegeben in nmol/g Leber. Keine CCl_4-Applikation. Den Tieren wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen Cd^{2+} in verschiedenen Dosen bzw. den Kontrolltieren isotone NaCl-Lösung verabreicht. Nahrungsentzug 18 Stunden vor Versuchsbeginn.

	Versuchsgruppe	Tierzahl	nmol/g Leber $\bar{x} \pm s_x$	%
2	NaCl-Öl, gefastet	5	$49,9 \pm 5,2$	100
5	Cd-Öl; 3x0,5 mg Cd^{2+}; gefastet	3	$37,6 \pm 3,1$	75,4
6	Cd-Öl; 3x1,0 mg Cd^{2+}; gefastet	3	$36,8 \pm 10,7$	73,7
7	Cd-Öl; 3x2,0 mg Cd^{2+}; gefastet	6	$28,8 \pm 4,3^*$	57,7
8	Cd-Öl; 3x3,0 mg Cd^{2+}; gefastet	3	$22,5 \pm 2,5$	45,1

$^*p < 0,001$

Abb. 12

Cytochrom P-450-Gehalt bei gefasteten, nur mit Cadmium behandelten Tieren in Abhängigkeit von der Cadmium-Dosis.



III.2.4 Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber nach Cadmium- und CCl_4-Exposition (Tab. 8)

Während bei den nur mit Cadmium belasteten Tieren eine dosisabhängige Abnahme des Cytochrom P-450-Gehalts in der Leber erfolgte, ließ sich dieser Effekt nach zusätzlicher Vorbehandlung der Tiere mit CCl_4 nicht mehr darstellen.

Tabelle 8

Cytochrom-P-450-Gehalt in der Leber in Abhängigkeit von der Cadmium-Dosis 6 Stunden nach CCl_4-Applikation, angegeben in nmol/g Leber. Den Kontrolltieren wurde anstelle von Cd^{2+} isotone Kochsalzlösung verabreicht. Nahrungsentzug 18 Stunden vor Versuchsbeginn.

Versuchsgruppe	Vorbehandlung der Tiere	Tierzahl	nmol/g Leber $\bar{x} \pm s_x$
4	NaCl-CCl_4, gefastet	9	$14,7 \pm 2,5$
9	Cd-CCl_4; 3x0,5 mg Cd^{2+};	7	$17,9 \pm 3,0$
10	Cd-CCl_4; 3x1,0 mg Cd^{2+}; gefastet	2	$16,5 \pm 3,3$
11	Cd-CCl_4; 3x2,0 mg Cd^{2+}; gefastet	11	$14,4 \pm 4,1$
12	Cd-CCl_4; 3x3,0 mg Cd^{2+}; gefastet	3	$14,8 \pm 3,5$

III.3. Andere labortechnische Untersuchungen

III.3.1. Gehalt an GSH und säurelöslichen Thiolen in der Leber (Abb. 13 und 14)

Es zeigte sich, daß der GSH-Gehalt in der Leber von der Cadmium-Dosis sowohl ohne als auch nach CCl_4-Applikation nahezu unbeeinflußt blieb (Abb. 13, 14). Demgegenüber wurde eine von der Cadmium-Dosis abhängige Zunahme der nicht an GSH gebundenen SH-Gruppen beobachtet.

Abb. 13

Gehalt von GSH und säurelöslichen Thiolen in der Rattenleber in Abhängigkeit von der Cadmium-Dosis. Den Tieren wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen Cd^{2+} in verschiedenen Dosen bzw. den Kontrolltieren isotone Kochsalzlösung verabreicht.

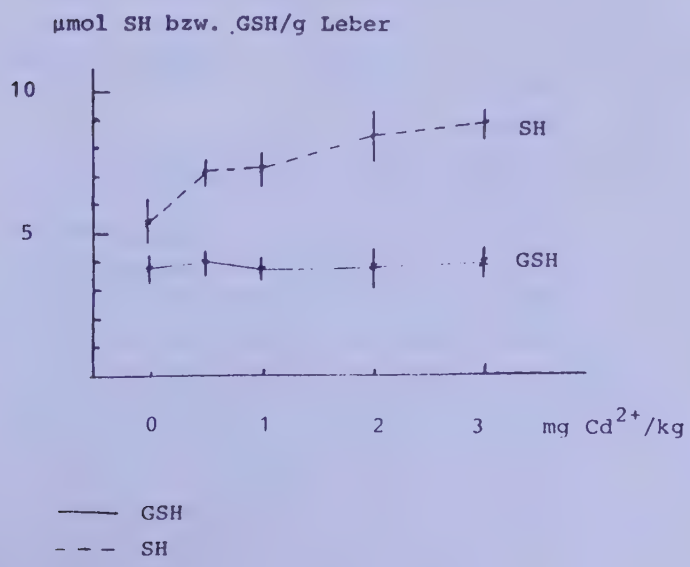
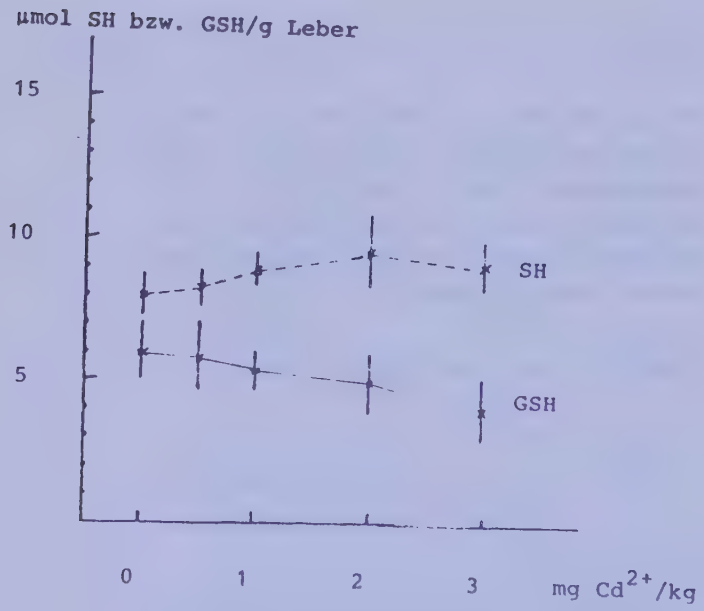


Abb. 14

Gehalt von GSH und säurelöslichen Thiolgruppen in der Rattenleber in Abhängigkeit von der Cadmium-Dosis nach CCl_4-Applikation. Den Tieren wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen Cd^{2+} in verschiedenen Dosen bzw. den Kontrolltieren isotone Kochsalzlösung verabreicht. (Werte von Dr. H. Menzel übernommen)



III.3.2. Thioneinsynthese in der Leber (Tab. 9 und Abb. 15)

Außerdem wurde die Thioneininduktion in Abhängigkeit von der Cadmium-Dosis verfolgt. Die Abbildung 15 zeigt, daß die Thioneinkonzentration in der Leber dosisabhängig ansteigt. Die Werte wurden ebenfalls freundlicherweise von Dr. Menzel überlassen. Aus der Abbildung 15 geht auch hervor, daß der Zunahme der nicht an Glutathion gebundenen säurelöslichen Thiolgruppen ein entsprechender Anstieg des Thioneingehaltes zugeordnet werden kann.

Tab. 9

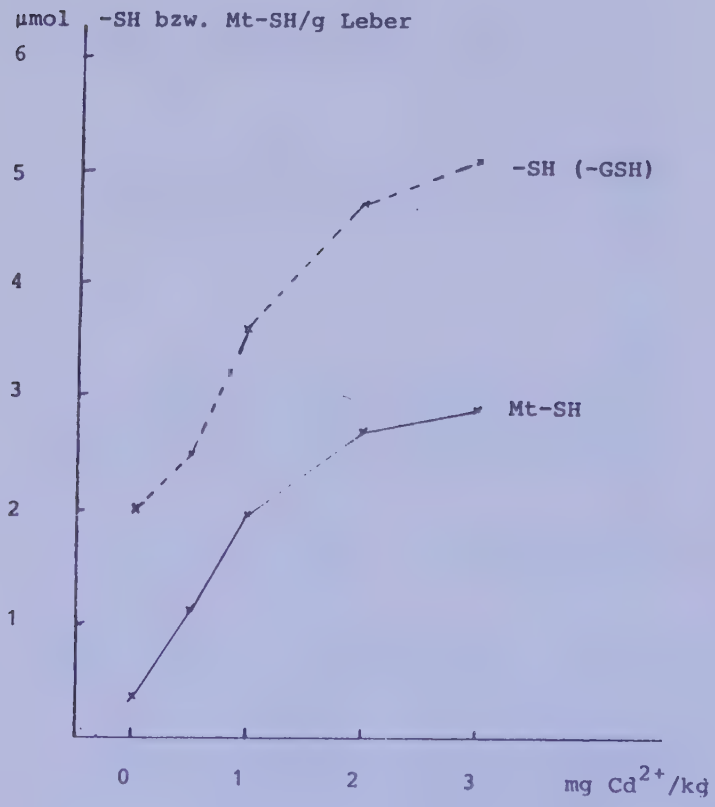
Einfluß von Cadmium auf den Thionein-Gehalt in der Leber und auf die nicht an Glutathion gebundenen säurelöslichen Thiolgruppen (Angabe in µmol Mt-SH bzw. -SH/g Leber).

Versuchsgruppe (gefastet)	Metallothionein $\bar{x} \pm s_x$	säurelösliche Thiolgruppen	Quotient
4: NaCl-CCl_4	0,3±0,1	2,0	0,7
9: 0,5 mg Cd^{2+}-CCl_4	1,1±0,1	2,5	2,3
10: 1,0 mg Cd^{2+}-CCl_4	2,0±0,1	3,6	1,8
11: 2,0 mg Cd^{2+}-CCl_4	2,7±0,0	4,7	1,7
12: 3,0 mg Cd^{2+}-CCl_4	2,9±0,1	5,1	1,8

Quotient = säurelösliche Thiolgruppen/Metallothionein

Abb. 15

Einfluß von Cadmium auf den Thionein-Gehalt in der Leber und auf die nicht an Glutathion gebundenen säurelöslichen Thiolgruppen.



-SH(-GSH) = säurelösliche Thiolgruppen (nicht an Glutathion gebunden)

Mt-SH = an Metallothionein gebundene SH-Gruppen

IV. Diskussion

IV.1. Problematik der Bestimmung gasförmiger Kohlenwasserstoffe in vivo

In in-vivo-Versuchen mit gefasteten Ratten schätzten Frank et al. (1980) die Äthan- und die Pentanexhalation auf 1,7 nmol/kg Körpergewicht/h und die Propanexhalation auf 0,7 nmol/kg/h.

Pentan wird als empfindlicherer Indikator für die Lipidperoxidation als Äthan angesehen, weil Arachidonsäure und Linolsäure am häufigsten in den Membranlipiden der Säugetiere vorkommen (Dumelin u. Tappel, 1977; Casini et al., 1979). Tappel (1980) gibt an, daß in Abhängigkeit von der Art der Fettsäure und des Katalysators 1,3 µmol Pentan pro Mol Linolsäure gebildet wird.

Kivits et al. (1981) ziehen jedoch in Erwägung, daß Pentan vom Organismus eher zurückgehalten werden könnte als Äthan. Frank et al. (1980) geben an, daß die Metabolisierungsrate der Alkane mit zunehmendem Molekulargewicht ansteigt. Dabei werden die Alkane durch das Monooxygenasesystem der Leber hydroxyliert.

Die Bestimmung der Alkane im Exsikkator erlaubt keine Aussage über die von der

Lipidperoxidation betroffenen Organe. Die Untersuchungen von Müller et al. (1981) sowie von Sagai und Tappel (1979) deuten darauf hin, daß die Leber an der Äthan- und Pentanbildung wesentlich beteiligt ist.

Andere Autoren sind der Meinung, daß auch im Gastrointestinaltrakt Alkane gebildet werden. Köster et al. (1977) weisen auf die Möglichkeit hin, daß dort Äthan entstehen könnte. Gelmont et al. (1981) folgern aus ihren Untersuchungen, daß die Darmflora von Ratten, die mit einer Vitamin-E-Mangeldiät ernährt wurden, die Hauptquelle des Pentan ist. Dabei erläutern sie, daß auch aus den Faeces Pentan freigesetzt wird. Als Ergebnis ihrer Untersuchungen finden Kivits et al. (1981), daß weniger Äthan und Pentan, sondern vielmehr Propan in den Faeces entsteht. Weiterhin schließen Gelmont et al. (1981) nicht aus, daß im Darmtrakt gebildete Alkane auch in die Atemwege gelangen.

In unseren Versuchen mit gefasteten, nicht mit CCl_4 behandelten Tieren wurden nur geringfügige Mengen von Propan und Pentan gemessen. Ähnliches wurde auch bei den ad libitum gefütterten, nicht mit CCl_4 behandelten Tieren beobachtet. Aus diesem Grund dürfte die Propan- und Pentanfreisetzung aus den Faeces eine unter-

geordnete Rolle spielen. Auch die in diesen Versuchen beobachtete Äthanbildung blieb von den Fressgewohnheiten der Tiere unbeeinflußt. Es bleibt jedoch unklar, ob unter diesen Bedingungen die Äthanbildung als Ergebnis einer konstanten low level-Lipidperoxidation in der Leber und anderen Organen anzusehen und/oder auf andere Prozesse zurückzuführen ist.

IV.2. Der Einfluß verschiedener Faktoren auf die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation

IV.2.1. Einfluß der Nahrung auf die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation

Vergleichbare Untersuchungen der in-vivo-Bestimmung von Propan bzw. Pentan nach CCl_4-Applikation bei Ratten sind uns nicht bekannt. Köster et al. (1977) und Kappus et al. (1978) schließen aus ihren Experimenten, daß nach CCl_4-Applikation neben Äthan in geringerem Umfang auch Propan abgeatmet wird. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen haben sie jedoch nicht dargestellt.

Die nach CCl_4-Behandlung gemessene Alkanbildung, insbesondere die Pentanfreisetzung, zeigte in unseren Versuchen eine hohe Varianz bei den ad libitum gefütterten Tieren. Köster et al. (1977) fanden in vergleichbaren Untersuchungen eine Äthanproduktion von 45 nmol/kg Körpergewicht in 4 Stunden. In anderen Versuchen lag der 4-Stunden-Wert bei etwa 35 nmol/kg (Kieczka und Kappus, 1980). Kappus et al. (1978) fanden einen 3-Stunden-Wert für Äthan von fast 30 nmol/kg Körpergewicht. Die Autoren weisen darauf hin, daß die Ergebnisse relativ stark variieren, wenn verschiedene Tiere benutzt werden. Dies wird besonders deutlich, wenn die Ergebnisse, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, in einen 6-Stunden-Wert umgerechnet werden.

Bei der Umrechnung unserer Ergebnisse in einen 4- bzw. 3-Stundenwert ergibt sich für Äthan eine Produktion von 51 bzw. 38 nmol/kg Körpergewicht bei den ad libitum gefütterten Ratten. Dabei wird davon ausgegangen, daß der Anstieg der Äthanfreisetzung linear verläuft (Köster et al., 1977). Ähnliche Befunde wurden auch in unseren Versuchen erhoben (Ergebnisse nicht dargestellt).

In jüngster Zeit haben mehrere Arbeitsgruppen versucht, den Einfluß der Nahrungsaufnahme auf die Lipidperoxidation quantitativ und qualitativ zu erfassen. So fanden Dillard et al. (1977) bei Ratten, die mit Kokosnußöl und einer Vitamin E-Mangeldiät ernährt wurden, eine wesentlich geringere Pentanproduktion der Tiere im Vergleich zu mit Maisöl gefütterten Ratten, die ebenfalls eine Vitamin E-Mangeldiät erhielten. Kokosnußöl enthält im Gegensatz zu Maisöl nur Spuren von Linolsäure. Auch von anderen Autoren wird die Beobachtung bestätigt, daß Ausmaß und Art der produzierten Alkane von der Zusammensetzung der Nahrungslipide abhängt (Iritani et al., 1980, De Toranzo et al., 1981).

Kivits et al., (1981) schließen aus ihren Untersuchungen, daß die Menge der zugeführten Lipide den Phospholipidgehalt der mikrosomalen Membranen der Leber wesentlich beeinflußt. So konnten sie nach Nahrungs-

entzug in vivo eine herabgesetzte Lipidperoxidation nachweisen. In unseren Vorversuchen schwankte die Nahrungsaufnahme bei den gefütterten Tieren zwischen 7g und 22 g in den letzten 18 Stunden vor CCl_4-Applikation. Es ist anzunehmen, daß auch der Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme vor der CCl_4-Applikation das Ausmaß der Lipidperoxidation bestimmt. Es zeigte sich nämlich in unseren Versuchen, daß noch nach 12-stündigem Nahrungsentzug die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation relativ stark variierte (Ergebnisse nicht dargestellt). Offenbar wird der steady state der CCl_4-induzierten Produktion von Alkanen im Hunger frühestens nach 18- stündigem Fasten erreicht.

Als weitere, vielleicht sogar entscheidende Ursache für die Abnahme der ausgeatmeten Alkane nach Nahrungsentzug bei den mit CCl_4 behandelten Tieren könnte außer dem verminderten Phospholipidgehalt der Leber auch eine verminderte Aktivität des mischfunktionellen Enzymsystems und damit eine geringere CCl_3-Radikalbildung angenommen werden. So wird von Zimmermann et al. (1973) die Abnahme der Lipidperoxidation hauptsächlich auf eine verminderte Radikalbildung zurückgeführt. In unseren Versuchen nahm der Cytochrom P-450-Gehalt in den Leberhomogenaten der unbehandelten Tiere beim Fasten jedoch nicht wesentlich ab.

Dieser Befund legt nahe, daß NADPH und/ oder Cytochrom-c-Reduktase limitierend sind. Jedoch ist der Einfluß des Ernährungsstatus auf den Stoffwechsel am Monooxygenasesystem bisher nur von einigen Autoren untersucht worden und wird unterschiedlich beurteilt. So fanden Thurman et al. (1975), daß NADPH, das zu über 2/3 in den Mitochondrien lokalisiert ist (Thurman und Kauffman, 1980), im Hungerversuch nicht im Pentose-Phosphat-Cyclus gebildet wird. Hierfür könnte ein Substratmangel, nämlich das Fehlen von Glucose-6-Phophat, verantwortlich gemacht werden, zumal Tiere im Hunger kaum noch Glykogen in der Leber enthalten (Staib und Scholz, 1968).

In anderen Veröffentlichungen wird dagegen eine Limitierung der NADPH-Bereitstellung ausgeschlossen (Estabrook und Linderlaub, 1979).

IV.2.2 Der Einfluß endogener Faktoren auf die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation

Aus den oben dargelegten Gründen gingen wir dazu über, die Tiere 18 Stunden vor Beginn der Messungen hungern zu lassen. Aber auch bei gefasteten Tieren wurde eine nicht gerade geringfügige Streuung der CCl_4-induzierten Produktion von Alkanen beobachtet.

Eine Erklärung geben vielleicht Beobachtungen, nach denen die Größe der Leber selbst bei gleichem Körpergewicht der Tiere variiert. Ferner kommt hinzu, daß die Leber-Parenchymzellen selbst eine unterschiedliche Fähigkeit haben, Lipidperoxide zu bilden bzw. durch GSH-Peroxidase zu reduzieren (Smith et al., 1979; Anundi et al., 1980; Yoshimura et al., 1980; Akerboom et al., 1981). So wird z. B. in den zentrilobulären Hepatocyten eine höhere Aktivität des mikrosomalen Enzymsystems gefunden (Smith et al., 1979). Sie ist offensichtlich auf einen höheren Cytochrom-P-450-Gehalt der zentrilobulären Hepatocyten zurückzuführen. Möglicherweise kann die in der Peripherie herabgesetzte Enzymaktivität auch als Zeichen einer Hypoxie gewertet werden, denn bei der Diffusion von Sauerstoff aus den Sinusoiden in die atmende Leber-

zelle entstehen O_2-Druckgradienten, die die im Gewebe gelöste O_2-Menge ungleichmäßig verteilen. Sie könnte möglicherweise so gering werden, daß sie für eine Aktivierung des Cytochrom P-450 nicht ausreicht. Des weiteren ist zu berücksichtigen, daß in der Zentralregion der Lobuli ein wesentlich geringerer Glutathion- sowie GSH-Peroxidase-Gehalt gefunden wird. (Smith et al., 1979; Yoshimura et al., 1980).

IV.2.3. Einfluß der Sauerstoffkonzentration auf die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation

In jüngsten Untersuchungen von Kieczka und Kappus (1980) und Stacey et al. (1982) wurde gezeigt, daß die Sauerstoffkonzentration eine wichtige Rolle in der CCl_4-induzierten Lipidperoxidation in vitro und in vivo spielt. So war bei den mit CCl_4 belasteten Ratten die Äthanexhalation in einer 20 %igen O_2-Atmosphäre höher als in einer 100 %igen. Dieser Effekt wurde jedoch nicht bei den Kontrolltieren beobachtet, denen kein CCl_4 verabreicht wurde. Als Ursache vermuten Kieczka und Kappus (1980), daß CCl_4 mit O_2 um die Bindungsstelle am Cytochrom P-450 des endoplasmatischen Retikulum konkurriert und somit CCl_4 in einer O_2-ärmeren Atmosphäre eher aktiviert wird.

Um bei dem geringeren Gefäßvolumen des Exsikkators eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurden die Tiere in unseren Versuchen in einer reinen Sauerstoffatmosphäre gehalten. Die Alkanexhalation war deshalb möglicherweise geringer als in einer 20%-igen Sauerstoffatmosphäre.

IV.2.4. Die Wirkung von CCl_4 auf den Cytochrom P-450-Gehalt in der Leber

Wir konnten die in der Literatur angegebene Beobachtung bestätigen, wonach CCl_4-Exposition die Cytochrom P-450-Aktivität erheblich beeinträchtigt (Plaa und Witschi, 1976, Recknagel und Glende, 1977).

Die Zerstörung des Cytochrom P-450 wurde bis vor wenigen Jahren in einen engeren Zusammenhang mit der Lipidperoxidation gebracht. Dabei wurde die Zerstörung des Cytochrom P-450 hauptsächlich als Folge eines direkten Angriffs von CCl_4-Metaboliten auf das Hämprotein angesehen. Recknagel und Glende (1977) vermuten jedoch, daß das $\dot{C}Cl_3$-Radikal die Bildung von Lipidperoxiden initiiert, die dann ihrerseits das Cytochrom P-450 schädigen. Nach dieser Hypothese stellt die Lipidperoxidation ein obligatorisches Bindeglied zwischen der CCl_3-Cl-Spaltung und der Zerstörung des CytochromP-450 dar.

Die Befunde von Poli et al. (1981) zeigen hingegen, daß zumindest die Lipidperoxidationsprodukte nicht hauptverantwortlich für die Abnahme des Cytochrom P-450-Gehaltes sind. Andere Untersuchungen deuten sogar darauf hin, daß die Lipidperoxidation nicht zu einer Zerstörung des Cytochrom P-450 führen muß. So erfolgt eine Schädigung des Cytochrom P-450 nach CCl_4-Applikation auch dann,wenn lipidperoxidative Prozesse praktisch ausgeschlossen werden können (De Groot und Haas, 1980; Colby et al., 1981).

IV.2.5 Einfluß des Fastens auf den GSH-Gehalt der Leber

Die von uns gleichzeitig durchgeführte Bestimmung des GSH zeigte nach 18-stündigem Nahrungsentzug einen 40 %igen Verlust bei den unbehandelten, d. h. nicht mit CCl_4 behandelten Tieren. Ähnliche Befunde wurden auch von anderen Autoren erhoben (Tateishi und Higashi, 1978). Offensichtlich wird das Cystein des Glutathion beim Fasten für die Proteinsynthese gebraucht (Tateishi und Higashi, 1978). Für den Schutz vor der Lipidperoxidation wird jedoch nur der stabile, nahrungsunabhängige GSH-Pool mit der längeren Halbwertszeit von 28,5 Stunden verantwortlich gemacht (Tateishi und Higashi, 1978). Den niedrigsten GSH-Gehalt, den die Rattenleber noch tolerieren kann, ohne daß der für den Schutz vor der Lipidperoxidation verantwortliche GSH-Pool beeinträchtigt wird, schätzen Tateishi und Higashi (1978) auf etwa 3 µmol/g Leber.

IV.3. Der Einfluß von Cadmium auf die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation in vivo

IV.3.1. Vergleich mit in vitro Versuchen in der Literatur

Wie bereits ausgeführt wurde, diskutieren verschiedene Autoren, daß der Basismechanismus für die durch Cadmium-Ionen hervorgerufene Toxizität die Lipidperoxidation sein könnte (Omaye und Tappel, 1975; Gabor et al., 1978; Magos und Webb, 1980; Reddy et al., 1981). Splittgerber u. Tappel (1979) zeigten in in-vitro-Versuchen, daß Cadmium-Ionen die Selen-abhängige GSH-Peroxidase der Rattenleber inhibieren. Nach Reddy et al. (1981) werden sowohl die GSH-Peroxidase- als auch die GSH-Transferase-Aktivität der Kalbsleber durch Cadmium-Ionen herabgesetzt. Aufgrund dieser Untersuchungen vermuteten wir, daß Cadmium die Lipidperoxiadtion fördert.

In allerjüngster Zeit sind jedoch Befunde erhoben worden, die sich mit der angegebenen Hypothese nicht ganz in Einklang bringen lassen. So haben sich die Arbeitsgruppen um Stacey mit der Wirkung von Cadmium und anderen Metallen auf die Lipidperoxidation in isolierten Hepatocyten-Suspensionen befaßt (Stacey u. Klaassen, 1980 und 1981). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen fanden die Autoren in in vitro-Versuchen mit

isolierten Hepatocyten-Suspensionen, daß trotz erheblichen Verlustes der LDH die Äthanfreisetzung in den ersten 90 Minuten der Inkubation mit Cadmium geringfügig erhöht ist. Die Autoren vermuten, daß diese Erhöhung auf eine Hemmung des Äthanstoffwechsels zurückzuführen ist und nicht auf einer Stimulierung der Lipidperoxidation beruht. Sie folgern aus ihren Untersuchungen, daß die Lipidperoxidation wahrscheinlich nicht ursächlich für die durch Cadmium hervorgerufene Cytotoxizität ist.

In unseren in vivo-Untersuchungen mit subakuter Cadmium-Belastung nahm hingegen die Menge der produzierten Alkane mit steigender Cadmium-Dosis zunehmend ab, sowohl bei den zusätzlich mit CCl_4-belasteten als auch bei den nur mit Cd^{2+} belasteten Ratten.

Die in in vitro gefundenen Ergebnisse sind also offensichtlich nicht mit unseren Versuchsbedingungen vergleichbar. In vivo Experimente haben den Vorteil, daß über einen größeren Zeitraum untersucht werden kann. So haben wir mit der Messung der Alkanproduktion erst 18 Stunden nach der letzten Cadmium-Applikation begonnen. Offenbar spielen sich also die für die Cadmium-Toxizität entscheidenden Regulationsvorgänge nicht innerhalb der ersten Stunden ab.

Vor diesem Hintergrund soll im folgenden erörtert

werden, welche Faktoren für die durch Cadmium in vivo bewirkte Verminderung der Lipidperoxidation verantwortlich sein können. Dabei werden sich zwei Gesichtspunkte herauskristallisieren:

1) ob Cadmium-Thionein eine Schutzfunktion auf die Lipidperoxidation ausübt,
2) ob Cd^{2+} durch eine Aktivitätshemmung des mischfunktionellen Oxidasesystems die Bildung von Radikalen erst gar nicht ermöglicht bzw. herabsetzt und somit die Lipidperoxidation hemmt.

IV.3.2 Die mögliche Schutzwirkung des Metallothionein

Cagen und Klassen (1979) diskutierten, ob Thionein dadurch, daß es den hochreaktiven Metabolit $\dot{C}Cl_3$ an die SH-Gruppen des Cystein bindet, vor der CCL_4-induzierten Lipidperoxidation schützen könnte. So fanden sie nach Applikation von ^{14}C-Tetrachlorkohlenstoff an Zink-vorbehandelten Ratten und anschließender säulenchromatographischer Auftrennung des Lebercytosol eine Bindung von ^{14}C an die Metallothionein-Fraktion. Vor diesem Hintergrund wäre eine Hemmwirkung der auch von uns nachgewiesenen Thioneininduktion auf die Lipidperoxidation durchaus denkbar.

In der Folge versuchten Cagen und Klaassen (1980) die Bedeutung des Metallothionein als Schutzfaktor näher zu definieren. In vitro trat in Leberhomogenaten eine meßbare Alkylierung des Metallothionein durch Jodazetat und Jodmethan erst dann auf, wenn die SH-Gruppen des Glutathion zu über 50 % blockiert waren. Gleichzeitg wurde aber ein protektiver Effekt des Metallothionein gegenüber der Alkylierung von Glutathion festgestellt. Aus diesen Untersuchungen folgerten die Autoren, daß eher Glutathion als Metallothionein elektrophile Substanzen, wie z. B. auch das $\dot{C}Cl_3$-Radikal, abfangen dürfte.

Diese Untersuchungsergebnisse haben überrascht, weil sie die Bedeutung des Metallothionein als potentiellen Radikalfänger wieder fraglich erscheinen ließen.

IV.3.3. Bedeutung des Cytochrom P-450 für die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation

Um weiteren Aufschluß über die grundlegenden Wirkungsbedingungen der von uns nach Cd^{2+}-Applikaton beobachteten Abnahme der Alkanproduktion zu bekommen, bestimmten wir außerdem den Cytochrom-P-450 Gehalt der Leber. Dieser zeigte eine relativ gute Relation zu den quantitativen Änderungen des Alkanstoffwechsels. Dabei ging die Abnahme der Alkanproduktion mit einem entsprechenden Abfall des Cytochrom-P-450-Gehaltes einher. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß eine Hemmung des mikrosomalen Monooxygenase-Enzymsystems als Wirkungsmechanismus des Cadmium auf die von uns beobachtete Abnahme der CCl_4- induzierten Lipidperoxidation angesehen werden kann.

Wie bereits ausgeführt wurde, ist das Monooxygenasesystem der Rattenleber außerordentlich empfindlich für eine Vielzahl endogener und exogener Faktoren, wie O_2-Konzentration, Fasten, Hormonstatus u.a. Die durch die Cd^{2+}-Ionen herabgesetzte Enzymaktivität des Monooxygenasesystems könnte auf einen Verlust des für den CCl_4-Metabolismus verantwortlichen Cytochrom P-450 beruhen. So vermuten Means et al. (1979), daß Cd^{2+} nur mit einer be-

grenzten Zahl der verschiedenen Cytochrom P-450 Formen interagiert und zwar in unterschiedlichem Ausmaß. Auch andere Autoren (Teare et al., 1977; Eaton et al., 1980; Krasny u. Holbrook, 1977; Wada et al., 1976) konnten einen Abfall der Cytochrom P-450-Aktivität nach Cd^{2+}-Exposition nachweisen. Es ist allerdings schwierig, die Befunde anderer Autoren mit unseren Ergebnissen genauer zu vergleichen, da die Dauer der Cd^{2+}-Exposition, der Zeitpunkt der Messung nach der Cd^{2+}-Exposition, die Dosis, die Art der Applikation, das Inkubationssystem und der Puffer variieren.

Als Ursache für den durch Cd^{2+} hervorgerufenen Cytochrom P-450-Abfall wird eine erhöhte Hämoxygenaseaktivität angenommen (Krasny u. Holbrook, 1977). Die erhöhte Hämoxygenaseaktivität wird erst mehrere Stunden nach Cd^{2+}-Exposition beobachtet, mit einem Maximum nach 36 - 48 Stunden (Krasny und Holbrook, 1977). Dieser Befund könnte die Beobachtung erklären, warum nicht sofort nach einmaliger Cd^{2+}-Exposition die Lipidperoxidation herabgesetzt ist. So konnten wir ähnlich wie in den von Stacey und Klaassen (1981) beschriebenen in vitro-Versuchen in unseren in vivo-Versuchen mit akuter Cadmium- Belastung sofort nach Cd^{2+}-Applikation kaum Veränderungen des Alkanstoffwechsels beobachten (Ergebnisse nicht

dargestellt, da die Versuche nur einmalig durchgeführt wurden). Krasny u. Holbrook (1977) weisen aber darauf hin, daß die Korrelation des Cytochrom P-450- Abfalls mit der erhöhten Hämoxygenaseaktivität bisher nur in der Leber beobachtet wurde. Sie bezweifeln deshalb, ob die Induktion der mikrosomalen Hämoxygenase durch Cd^{2+} für den Abfall des Cytochrom P-450 allein verantwortlich gemacht werden kann.

Eaton et al. (1980) schließen nicht aus, daß die erhöhte Hämöxygenaseaktivität auch als Folge eines direkten Angriffs von Cd^{2+} auf das Cytochrom P-450 aufgefaßt werden könnte. Die Zerstörung des Cytochrom P-450 durch Cd^{2+} könnte z. T. durch eine direkte Interaktion von Cd^{2+}-Ionen mit SH-Gruppen des Hämprotein bedingt sein (Means et al., 1979).

IV.3.4 Der Einfluß des Energiestoffwechsels auf die Lipidperoxidation

Es bleibt unklar, welche Rolle die Alteration des Energiestoffwechsels auf die Aktivität des Monooxygenase-Systems spielt. Erste Hinweise für eine Hemmung des mitochondrialen Systems in der Leber liefern die Arbeiten von Gonsky (1980). Der Autor fand, daß bei Ratten, denen zwischen 5 und 30 Tagen $CdCl_2$ subcutan injiziert wurde, der Sauerstoffverbrauch in den Mitochondrien herabgesetzt ist. Dabei ist die Sauerstoffaufnahme von der Dauer der Cadmium-Exposition abhängig.

Man könnte spekulieren, ob durch Cadmium die Bildung von NADPH gehemmt wird. Dabei wird davon ausgegangen, daß NADPH der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Aktivierung des mischfunktionellen Oxidasesystems ist und daß außerdem die Mitochondrien die wichtigste Quelle der reduzierenden Äquivalente darstellen (Thurmann und Kauffman, 1980). Untersuchungen von Müller (1983) an isolierten Hepatozyten zeigen, daß Cadmium die Aktivitäten der NADP regenerierenden Enzyme wie Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Isocitratdehydrogenase und des Malatenzyms zeit- und konzentrationsabhängig hemmt.

IV.3.5 Der Einfluß anderer Faktoren auf die Lipidperoxidation

Als Ursache für die verminderte Aktivität des Monooxygenase-Systems nach Cd^{2+}-Applikation könnten auch morphologische Veränderungen in Betracht gezogen werden. Da das mischfunktionelle Enzymsystem streng strukturgebunden ist, könnten die durch die Alteration des Energiestoffwechsels hervorgerufenen strukturellen Veränderungen des endoplasmatischen Reticulum die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation herabsetzen.

Es wäre auch denkbar, daß eine Verminderung der Anzahl aktiver Leber-Parenchymzellen durch Cadmium als Ursache für einen Abfall der CCl_4-induzierten Lipidperoxidation in Frage kommt. Jedoch werden die durch Cd^{2+}-Ionen hervorgerufenen Veränderungen in der Leber unterschiedlich beurteilt (Samawickrama, 1979).

Für die Wirkung von Cadmium auf die Lipidperoxidation in vivo könnte auch ein beschleunigter Metabolismus der Alkane diskutiert werden. Die Alkanfreisetzung ist nämlich sowohl mit als auch ohne CCl_4 nach Cadmiumapplikation gleichermaßen herabgesetzt.

IV.3.6 Schlußfolgerungen

Die hier dargestellten Versuche zeigen, daß der Basismechanismus für die durch Cadmium hervorgerufene Toxizität nicht auf der Lipidperoxidation beruht. Die vorgetragene Hypothese findet Unterstützung durch kürzlich publizierte Befunde von Stacey u. Kappus (1982), die in in vitro-Versuchen mit isolierten Hepatocyten in den ersten 90 Minuten der Inkubation mit Cadmium nur eine geringfügige Erhöhung der Lipidperoxidation finden. Offenbar spielen sich also die für die Cadmium-Toxizität entscheidenden Regulationsvorgänge nicht innerhalb der ersten Stunden ab.

Unter Berücksichtigung der aus der Literatur bekannten Befunde sprechen die Ergebnisse unserer Untersuchungen dafür, daß die nach Cadmium-Applikation beobachtete Abnahme der Alkanproduktion nicht eine einfache Sekundärreaktion darstellt, sondern vielmehr als Folge parallel verlaufender Vorgänge aufzufassen ist. In erster Linie dürfte eine verminderte Radikalbildung von CCl_4-Metaboliten für die Wirkung von Cadmium auf die CCl_4-stimulierte Lipidperoxidation verantwortlich gemacht werden. Als Ursache könnte der durch Cadmium hervorgerufene, den Änderungen der Alkanproduktion weitgehend parallele Abfall des Cytochrom P-450 angenommen werden. Es bleibt jedoch unklar, welche Rolle die nach Cadmium-Behandlung beobachtete Alteration des Energiestoff-

wechsels (Gonsky, 1980) auf die Aktivität des Cytochrom P-450-Systems spielt. Thurmann und Kaufmann (1980) vermuten, daß ein verminderter NADPH-Pool für die herabgesetzte Radikalbildung am Monooxygenase-System verantwortlich gemacht werden kann. Es erscheint aber eher spekulativ, daß Cadmium die Bildung von NADPH hemmt.

Als zusätzlicher Faktor könnte die durch Cadmium hervorgerufene Thioneininduktion die Lipidperoxidation dadurch hemmen, daß Thionein den hochreaktiven Metabolit $\cdot CCl_3$ an die SH-Gruppen des Cystein bindet (Cagen u. Klaassen, 1979).

V. Zusammenfassung

An männlichen Wistar-Ratten wurde die Wirkung einer subakuten Belastung mit Cadmium auf die normale und CCl_4-stimulierte Lipidperoxidation untersucht. Als Maß der Lipidperoxidation wurde die quantitative gaschromatographische Bestimmung von Äthan, Propan und Pentan in der Atemluft benutzt.

Die CCl_4-stimulierte Alkanexhalation zeigte bei den ad libitum (mit Standarddiät) gefütterten Tieren eine erhebliche Streuung. Die Hauptversuche wurden deshalb an Hungertieren durchgeführt. Die gewonnenen Befunde lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

1.) Die Grundtendenz war ein dosisabhängiger Abfall der Alkanexhalation, der jedoch erst nach Stimulation der Lipidperoxidation mit CCl_4 besonders deutlich zum Ausdruck kam.

2.) Der Cytochrom P-450-Gehalt nahm paralell zu den quantitativen Änderungen des Alkanstoffwechsels nach Cadmium-Applikation ab.

3.) Der Cadmiumthionein-Gehalt in der Leber stieg in Abhängigkeit von der Cadmium-Dosis kontinuierlich an.

4.) Demgegenüber blieb der Gehalt des reduzierten Glutathion (GSH) in der Leber von der Cadmium-Dosis nahezu unbeeinflußt.

Die von Stacey u. Kappus (1982) in vitro erhobenen Befunde, wonach die Lipidperoxidation nach Cadmium-Applikation geringfügig ansteigt, sind nicht mit unseren Versuchsbedingungen vergleichbar. In vivo spielen sich die für die Cadmium-Toxizität entscheidenen Regulationsvorgänge nicht innerhalb der ersten Stunden ab. So könnte Cadmium-Thionein als Radikalfänger eine gewisse Schutzfunktion auf die CCl_4-induzierte Lipidperoxidation ausüben. In erster Linie dürfte jedoch eine verminderte Radikalbildung von CCl_4-Metaboliten für die Wirkung von Cadmium auf die CCl_4-stimulierte Lipidperoxidation verantwortlich gemacht werden.

VI. Anhang (Chromatogramme + Beispiele)

Alkanproduktion 6 Stunden nach CCl_4-Applikation in Abhängigkeit von der Cadmiumdosis

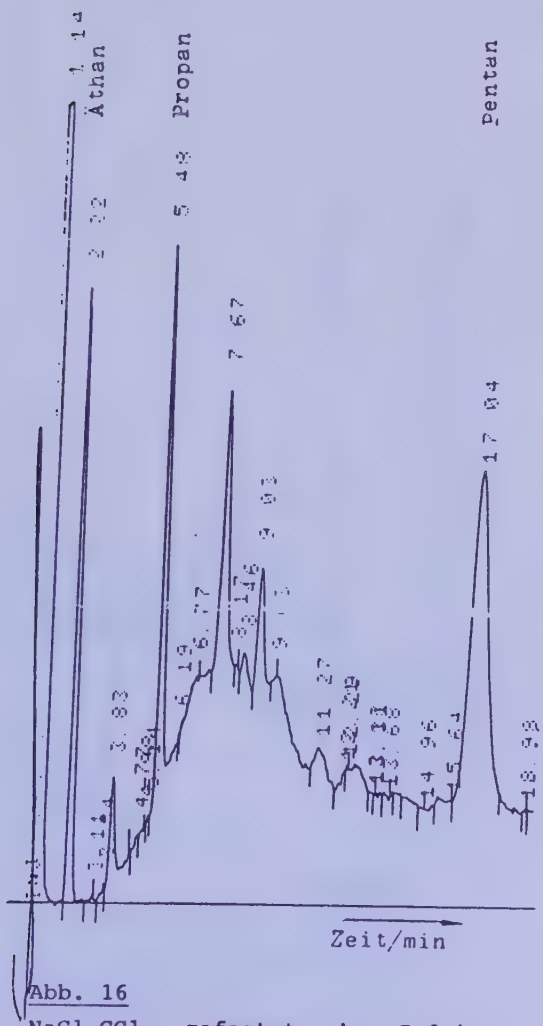


Abb. 16
$NaCl-CCl_4$, gefastet, ohne Cadmiumbelastung, Versuchsgruppe 4 (Kontrolle)

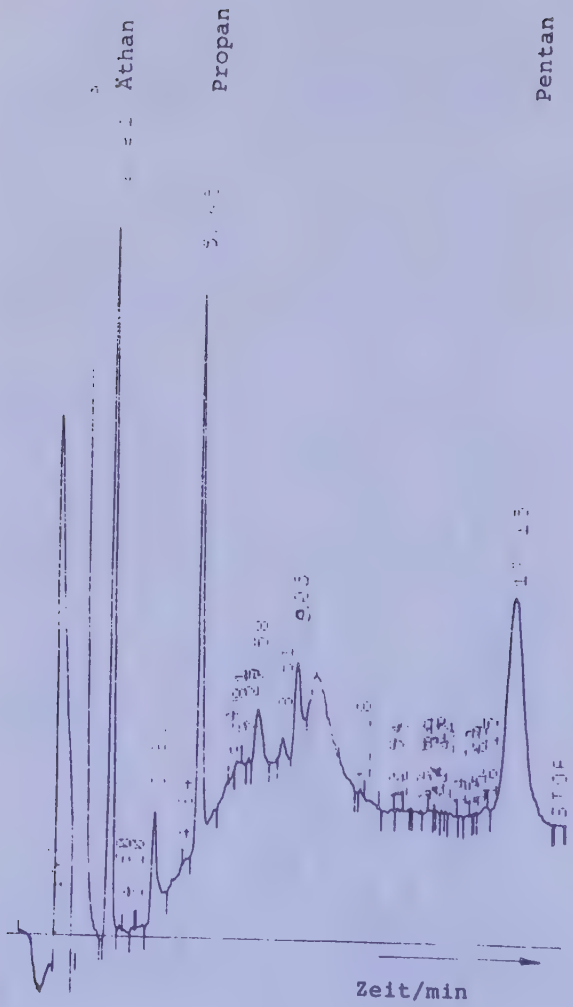


Abb. 17

Cd-CCl_4, 3 x 0,5 mg Cd^{2+}
(Versuchsgruppe 9)

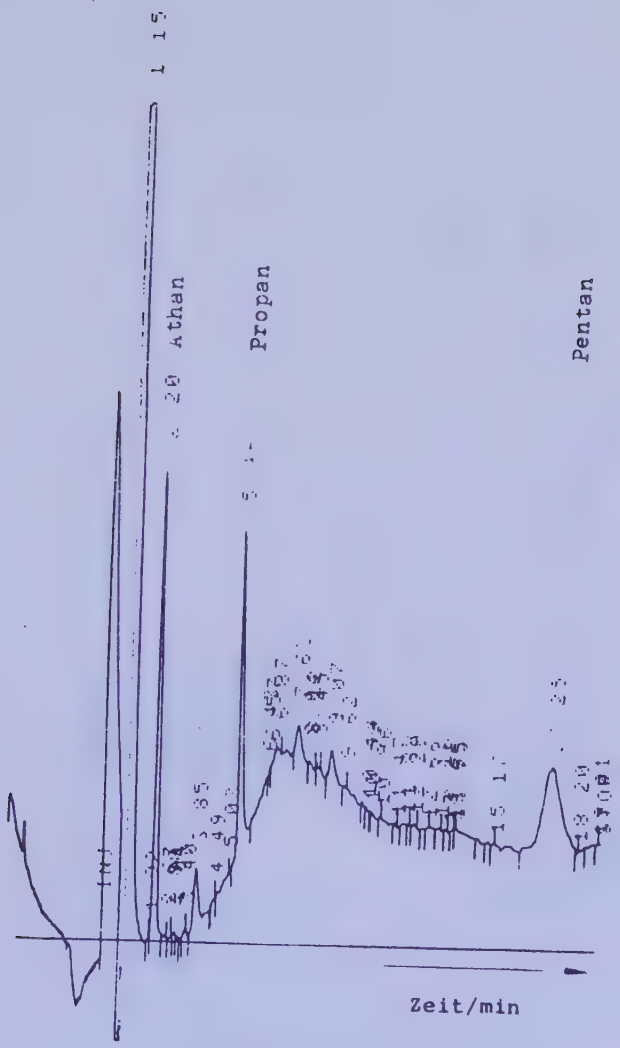


Abb. 18

$Cd\text{-}CCl_4$, 3 x 1,0 mg Cd^{2+}
(Versuchsgruppe 10)

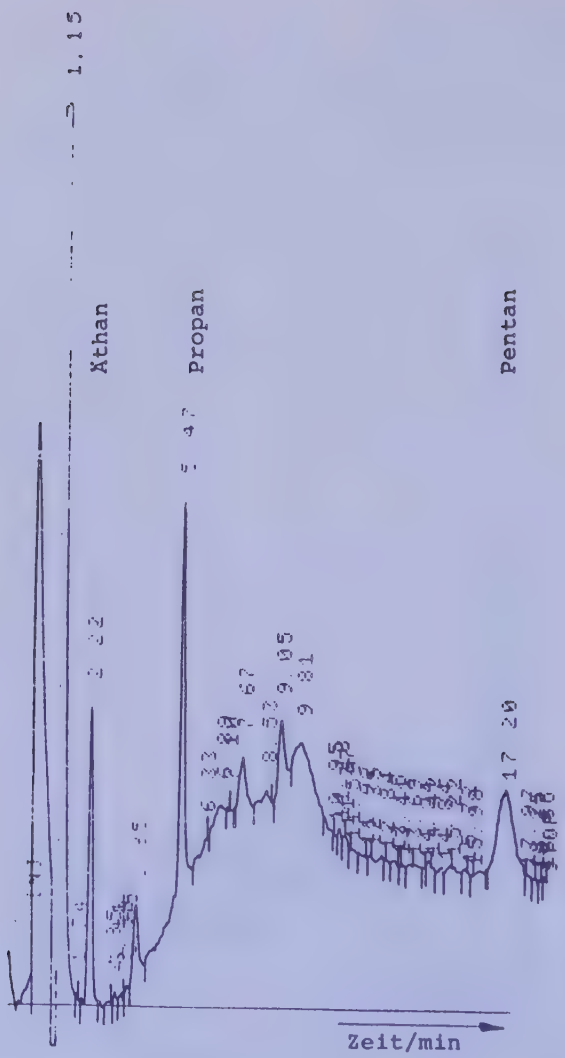


Abb. 19

$Cd\text{-}CCl_4$, 3 x 2,0 mg Cd^{2+}
(Versuchsgruppe 11)

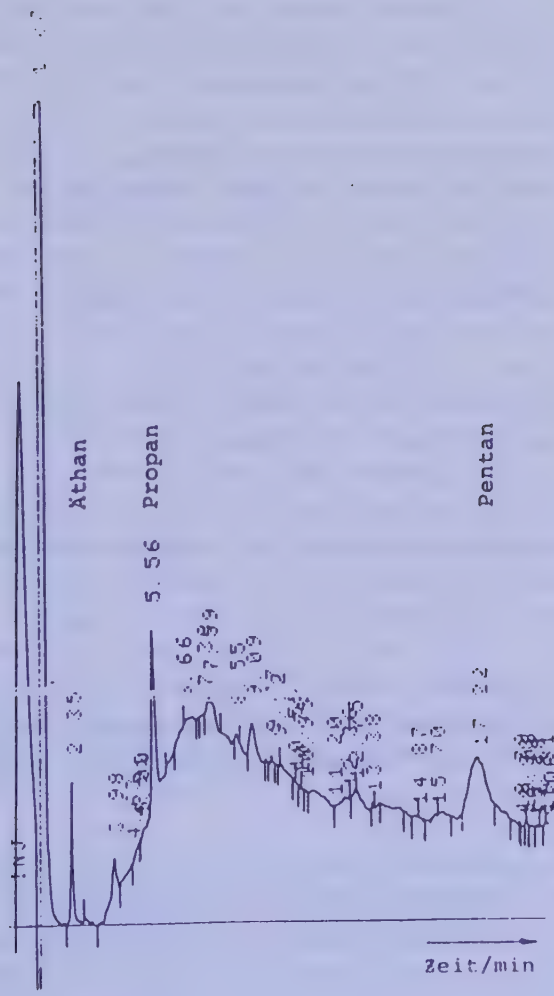


Abb. 20
Cd-CCl_4, 3 x 3,0 mg Cd^{2+}
(Versuchsgruppe 12)

VII. Literatur

Ahr, H.J., King, L.J., Nastainczyk, W., Ullrich, V.: The mechanism of chloroform and carbonmonoxide formation from carbontetrachloride by microsomal cytochrome P-450. Biochem. Pharmacol. 29, 2855 - 2861 (1980)

Akerboom, T.P.M., Gärtner, M., Sies, H.: Cellular hydroperoxide metabolism: The roles of glutathione peroxidases and of catalase in liver. Bull. Eur. Physiopath. Resp. 17, 221 - 227 (1981)

Anundi, I., Rajs, J., Högberg, J.: Chloroacetamide hepatotoxicity: Hydropic degeneration and lipid peroxidation. Toxicol. Appl. Pharmacol. 55, 273 - 280 (1980)

Asakawa, T., Matsushita, S.: Thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides under anaerobic condition. Agr. Biol. Chem. 45, 453-457 (1981).

Balevska, P.S., Russanov, E.M., Kassabova, T.A.: Studies on lipid peroxidation in rat liver by copper deficiency. Int. J. Biochem. 13, 489 - 493 (1981).

Buege, J.A., Aust, S.D.: Microsomal lipid peroxidation. in: Methods in enzymology. Fleischer, S., Packer, L. (eds.) 51, Academic Press. New York 1978, 302 - 310

Burk, R.F., Lane, J.M.: Ethane production and liver necrosis in rats after administration of drugs and other chemicals. Toxicol. Appl. Pharmacol. 50, 467 - 478 (1979)

Burk, R.F., Lawrence, R.A.: Non-selenium - dependent glutathione peroxidase. in: Functions of glutathione in liver and kidney. Sies, H., Wendel, A. (eds.) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1978, 114 - 119

Bus, J.S., Gibson, J.E.: Lipid peroxidation and its role in toxicology. in: Reviews in biochemical toxicology. Hodgson, E., Bend, J., Philpot, R.M. (eds.) Elsevier North Holland, New York, Amsterdam, Oxford 1979, 125 - 149

Cagen, S.Z., Klaassen, C.D.: Protection of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by zinc: role of metallothionein. Toxicol. Appl. Pharmacol. 51, 107 - 116 (1979)

Cagen, S.Z., Klaassen, C.D.: Binding of glutathione-depleting agents to metallothionein. . Toxicol. Appl. Pharmacol. 54, 229 - 237 (1980)

Casini, A.F., Benedetti, A., Ferrali, M., Comporti, M.: Binding of products originating from the peroxidation of liver microsomal lipids to the non-lipid constituents of the microsomal membrane. Chem. Biol. Interact. 25, 211 - 227 (1979)

Colby, H.D., Brogan, W.C., Miles, P.R.: Carbon tetrachloride-induced changes in adrenal microsomal mixed-function oxidases and lipid peroxidation. Toxicol. Appl. Pharmacol. 60, 492 - 499 (1981)

Cooper, D.Y., Rosenthal, O., Snyder, R., Witmer, C.: Cytochrome P-450 and b_5. Plenum Press, New York and London 1975

De Duve, C., Hayaishi, O. (eds.): Tocopherol, oxygen an biomembranes. Eslevier/North-Holland. Biomedical Press. Amsterdam, New-York 1978

De Groot, H., Haas, W.: O_2-independent damage of cytochrome P450 by CCl_4-metabolites in hepatic microsomes. FEBS Lett. 115, 253 - 256 (1980)

De Ruiter, N., Muliawan, H., Kappus, H.: Ethane production of mouse peritoneal macrophages as indication for lipid peroxidation and the effect of heavy metals. Toxicology 17, 265 - 268 (1980)

De Ruiter, N., Ottenwälder, H. Muliawan, H., Kappus, H.: Ethane formation of isolated rat hepatocytes due to carbon tetrachloride. Toxicology Letters 8, 265 - 271 (1981)

De Ruiter, N., Ottenwälder, H., Muliawan, H., Kappus, H.: Lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes measured by ethane and n-pentane formation. Arch. Toxicol. 49, 265 - 273 (1982)

De Toranzo, E.G.D., Marzi, A., Castro, J.A.: Effects of cysteine and cystamine on the carbon tetrachloride induced decrease in arachidonic acid content of rat liver microsomal phospholipids. Toxicology 19, 77 - 82 (1981)

Dillard, C.J., Dumelin, E.E., Tappel, A.L.: Effect of dietary vitamin E on expiration of pentane and ethane by the rat. Lipids 12, 109 - 114 (1977)

Dillard, C.J., Sagai, M., Tappel, A.L.: Respiratory pentane: a measure of in vivo lipid peroxidation applied to rats fed diets varying in polyunsaturated fats, vitamin E and selenium and exposed to nitrogen dioxide. Toxicol. Lett. 6, 251 - 256 (1980)

Donovan, D.H., Menzel, D.B.: Mechanisms of lipid peroxidation: iron catalysed decomposition of fatty acid hydroperoxides as the basis of hydrocarbon evolution in vivo. Separatum Experientia 34, 775 - 776 (1978)

Dougherty, J.J., Hoekstra, W.G.: Iron as a stimulator of lipid peroxidation in vivo in selenium and vitamin E deficient rats. Fed. Proc. 36, 1151 (1977)

Dumelin, E.E., Tappel, A.L.:.: Hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation of polyunsaturated fatty acids and decomposition of preformed hydroperoxides. Lipids 12, 894 - 900 (1977)

Eaton, D.L., Stacey, N.H., Wong, K.L., Klaassen, C.D.: Dose-response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase und cytochrome P-450. Toxicol. Appl. Pharmacol. 55, 393 - 402 (1980)

Estabrook, R.W., Linderlaub, E.(eds.): The induction of drug metabolism. F. K. Schatthauerverlag, Stuttgart, New York 1979

Flohé, L., Günzler, W.A., Ladenstein, R.: Glutathione peroxidase. in: Glutathione: metabolism and function. Arias, I.M., Jacoby, W.B. (eds.) Raven Press New York 1976, 115 - 135

Frank, H., Hintze, T., Bimboes, D., Remmer, H.: Monitoring lipid peroxidation by breath analysis: Endogenous hydrocarbons and their metabolic elimination. Toxicol. Appl. Pharmacol. 56, 337 - 344 (1980)

Friberg, L., Kjellström, T., Nordberg, G., Piscator, M. (eds.): Handbook on the toxicology of metals. Chapter 21: Cadmium. Friberg, L., Nordberg, G., Vouk, V.B. Elsevier/North-Holland Biochemical Press 1979

Gabor, S., Anca, Z., Bordás, E.: Cadmium-induced lipid peroxidation in kidney and testes. Effect of zinc and copper. Rev. roum. Biochem. 15, 113 - 117 (1978)

Gee, D.L., Tappel, A.L.: Production of volatile hydrocarbons by isolated hepatocytes: an in vitro model for lipid peroxidation studies. Toxicol. Appl. Pharmacol. 60, 112 - 120 (1981)

Gelmont, D., Stein, R.A., Mead, J.F.: The bacterial origin of rat breath pentane. Biochem. Biophys. Commun. 102, 932 - 936 (1981)

Gibson, D.D., Hornbrook, K.R., McCay, P.B.: Glutathione-dependent inhibition of lipid peroxidation by a soluble heat-labile factor in animal tissues. Biochim. Biophys. Acta 620, 572 - 582 (1980)

Gonsky, Ya.I.: Effect of cadmium chloride on intensity of tissue respiration of rat liven and brain homogenates. (Original in Russisch) Ukr. Biochem. J. 52, 706 - 710 (1980)

Greim, H.: Synthesesteigerung und Abbauhemmung bei der Vermehrung der mikrosomalen Cytochrome P-450 und b-5 durch Phenobarbital. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 266, 261 - 275 (1970)

Gutteridge, J.M.C.: Thiobarbituric acid - reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates. FEBS Lett. 128, 343 - 346 (1981)

Hafemann, D.G., Hoekstra, W.G.: Lipid peroxidation in vivo during vitamin E and selenium deficiency in the rat as monitored by ethane evolution. J. Nutr. 107, 666 - 672 (1977)

Hafemann, D.G., Hoekstra, W.G.: Protection against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in the rat by dietary vitamin E, selenium and methionine as measured by ethane evolution. J. Nutr. 107, 656 - 665 (1977)

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. The role of superoxide and hydroxyl radicals. FEBS Lett. 128, 347 - 352 (1981)

Iritani, N., Fukuda, E., Kitamura, Y.: Effect of corn oil feeding on lipid peroxidation in rats. J. Nutr. 110, 924 - 930 (1980)

Kägi, J.H.R., Himmelhoch, S.R., Whanger, P.D., Bethune, J.L., Vallee, B.L.: Equine hepatic and renal metallothioneins. J. Biol. Chem. 249, 3537 - 3542 (1974)

Kappus, H., Köster, U., Köster - Albrecht, D., Kieczka, H., Remmer, H.: Lipid peroxidation induced by ethanol and halogenated hydrocarbons in vivo as measured by ethane exhalation. in: Functions of glutathione in liver and kidney. Sies, H., Wendel, A. (eds.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1978, 176 - 182

Kappus, H., Sies, H.: Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. Experientia 37, 1233 - 1241 (1981)

Kieczka, H., Kappus, H.: Oxygen dependence of CCl_4-induced lipid peroxidation in vitro and in vivo. Toxicology Letters 5, 191 - 196 (1980)

Kivits, G.A.A., Ganguli-Swarttouw, M.A.C.R., Christ, E.J.: The composition of alkanes in exhaled air of rats as a result of lipid peroxidation in vivo. Effects of dietary fatty acids, vitamin E and selenium. Biochim. Biophys. Acta 665, 559 - 570 (1981)

Köster, U., Albrecht, D., Kappus, H.: Evidence for carbon tetrachloride- and ethanol-induced lipid peroxidation in vivo demostrated by ethane production in mice and rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 41, 639 - 648 (1977)

Kornbrust, D.J., Mavis, R.D.: Microsomal lipid peroxidation. I. Characterisation of the role of iron and NADPH II Stimulation by carbon tetrachloride. Mol. Pharmacol. 17, 400 - 414 (1980)

Krasny, H.C., Holbrook, D.J.: Effects of cadmium on microsomal hemoproteins and heme oxygenase in rat liver. Mol. Pharmacol. 13, 759 - 765 (1977)

Lawrence, R.A., Burk, R.F.: Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 952 - 958 (1976)

Lawrence, R.A., Parkhill, L.K., Burk, R.F.: Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: Its nature and the effect of selenium deficiency. J. Nutr. 108, 981 - 987 (1978)

Leung, H.W., Vang, M.J., Mavis, R.D.: The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. Biochim. Biophys. Acta 664, 266 - 272 (1981)

Liebermann, M., Mapson, L.W.: Genesis and biogenesis of ethylene. Nature (London) 204, 343 - 345 (1964)

Lindstrom, T.D., Anders. M.W.: Effect of agents known to alter carbon tetrachloride hepatotoxicity and cytochrome P-450 levels on carbon etrachloride-stimulated lipid peroxidation and ethane expiration in the intact rat. Biochem. Pharmacol. 27, 563 - 567 (1978)

Litov, R.E., Matthews, L.C., Tappel, A.L.: Vitamin E protection against in vivo lipid peroxidation initiated in rats by methyl ethyl ketone peroxide as monitored by pentane. Toxicol. Appl. Pharmacol. 59, 96 - 106 (1981)

Magos, L., Webb, M.: The interaction of selenium with cadmium and mercury. CRC Crit. Rev. Toxicol. 8, 1 - 42 (1980)

McCay, P.B., Gibson, D.D., Fong, K.L., Hornbrook, K.R.: Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. Biochim. Biophys. Acta 431, 459 - 468 (1976)

McCord, J.M., Beauchamp, C.O., Gosim, S., Misra, H.P., Fridovich, I.: Superoxide and superoxide dismutase. in: Oxidases and related redox systems. Vol. 1. King, T.E., Mason, H.S., Morrison, M. (eds.) University Park Press, Baltimore, London, Tokyo 1976, 51 - 76

Means, J.R., Carlson, G.P., Schnell, R.C.: Studies on the mechanism of cadmium-induced inhibition of the hepatic microsomal mono-oxygenase of the male rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 48, 293 - 304 (1979)

Morgenstern, R., De Pierre, J.W., Lind, C., Guthenberg, C.: Benzo ( ) pyrene quinones can be generated by lipid peroxidation and are conjugated with glutathione by glutathione S-transferase B from rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 682 - 690 (1981)

Müller, L.: Untersuchungen zur Rolle der Cadmium-stimulierten Lipidperoxidation in der Cadmiumgiftigkeit in isolierten Leberparenchymzellen der Ratte. Dissertation, Düsseldorf (1983), in Vorbereitung

Müller, A., Graf, P., Wendel, A., Sies, H.: Ethane production by isolated perfused rat liver (A system to study metabolic effects realted to lipid peroxidation). FEBS Lett. 126, 241 - 245 (1981)

Nair, P.P., Patnaik, R.N., Hauswirth, J.W.: Cellular transport and binding of -tocopherol. in: Tocopherol, oxygen and biomembranes. De Duve, C., Hayaishi, O. (eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York 1978, 121 - 130

Noelle, R.J., Lawrence, D.A.: Determination of glutathione in lymphocytes and possible association of redox state and proliferative capacity of lymphocytes. Biochem. J. 198, 571 - 579 (1981)

Nohl, H.: Physiological and pathophysiological significance of superoxide-radicals and the regulatory role of the enzyme superoxide dismutase. Klin. Wochenschr. 59, 1081 - 1091 (1981)

Omaye, S.T., Tappel, A.L.: Effect of cadmium chloride on the rat testicular soluble selenoenzyme glutathione peroxidase. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 12, 695 (1975)

Omura, T., Sato, R.: The carbon monoxide combining pigment of liver microsomes. I. Evidence for its heme protein nature. II. Solubilization, purification and properties. J. Biol. Chem. 239, 2370 - 2385 (1964)

Pabst, M.J., Habig, W.H., Jakoby, W.B.: Glutathione S-transferase A. J. Biol. Chem. 249, 7140 - 7150 (1974)

Plaa, G.L., Witschi, H.: Chemicals, drugs and lipid peroxidation. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 16, 125 - 141 (1976)

Poli, G., Cheeseman, K., Slater, T.F. Dianzani, M.U.: The role of lipid peroxidation in CCl_4-induced damage to liver microsomal enzymes: comparative studies in vitro using microsomes and isolated liver cells. Chem. Biol. Interact. 37, 13 - 24 (1981)

Pryor, W.A. (ed.): Free radicals in biology. Vol. 1 Academy Press, New York (1976)

Recknagel, R.O., Glende, E.A.: Lipid peroxidation: a specific form of cellular injury. in: Handbook of physiology. Section 9: Reactions to environmental agents. Lee, D.H.K., Falk, H.L., Murphy, S.D., Geiger, S.R. (eds.) American Physiological Society, Bethesda, Maryland 1977, 591 - 601

Recknagel, R.O., Glende, E.A.: Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. CRC Crit. Rev. Toxicol. 2, 263 - 297 (1973)

Recknagel, R.O.: Carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pharmacol. Rev. 19, 145 - 208 (1967)

Reddy, C.C., Scholz, R.W., Massaro, E.J.: Cadmium, methylmercury, mercury and lead inhibition of calf liver glutathione S-transferase exhibiting selenium-independent glutathione peroxidase activity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 61, 460 - 468 (1981)

Reiner, O., Athanassopoulos, S., Hellmer, K.H., Murray, R.E., Uehleke, H.: Bildung von Chloroform aus Tetrachlorkohlenstoff in Lebermikrosomen. Lipidperoxidation und Zerstörung von Cytochrom P-450. Arch. Toxicol. 29, 219 - 233 (1972)

Riely, C.A., Cohen, G., Liebermann, M.: Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation. Science 183, 208 - 210 (1974)

Rosen, H., Klebanoff, S.J.: Role of iron and ethylenediaminetetraacetic acid in the bactericidal activity of a superoxide anion-generating system. Arch. Biochem. Biophys. 208, 512 - 519 (1981)

Sagai, M., Tappel, A.L.: Effect of vitamin E on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation as demonstrated by in vivo pentane production. Toxicol. Lett. 2, 149 - 155 (1978)

Sagai, M., Tappel, A.L.: Lipid peroxidation induced by some halomethanes as measured by in vivo pentane production in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 49, 283 - 291 (1979)

Samarawickrama, G.P.: Biological effects of cadmium in mammals. in: The chemistry, biochemistry and biology of cadmium. Webb, M. (ed.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford 1979, 341 - 422

Samarawickrama, G.P.: Effects of cadmium on the liver. in: The chemistry, biochemistry and biology of cadmium. Webb, M. (ed.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford 1979, 370 - 373

Shimizu, T., Kondo, K., Hayaishi, O.: Role of prostaglandin endoperoxides in the serum thiobarbituric acid reaction. Arch. Biochem. Biophys. 206, 271 - 276 (1981)

Sies, H., Gerstenecker, C., Menzel, H., Flohé, L.: Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidation of glutathione by hydroperoxides. FEBS Lett. 27, 171 - 175 (1972)

Slater, T.F.: Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat; a speculative mechanism based on activation. Nature, (London) 209, 36 - 40 (1966)

Slater, T.F., Sawyer, B.C.: The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogeno-alkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. Biochem. J. 123, 805 - 814 (1971)

Smith, M.T., Loveridge, N., Wills, E.D., Chayen, J.: The distribution of glutathione in the rat liver lobule. Biochem. J. 182 103 - 108 (1979)

Splittgerber, A.G., Tappel, A.L.: Inhibition of glutathione peroxidase by cadmium and other metal ions. Arch. Biochem. Biophys. 197, 534 - 542 (1979)

Stacey, N.H., Kappus, H.: Comparison of methods of assessment of metal-induced lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. J. Toxicol. Environ. Health. 9, 277 - 285 (1982)

Stacey, N.H., Klaassen, C.D.: Cadmium uptake by isolated rat hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 55, 448 - 455 (1980)

Stacey, N.H., Klaassen, C.D.: Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. J. Toxicol. Environ. Health. 7, 139 - 147 (1981)

Stacey, N.H., Klaassen, C.D.: Interaction of metal ions with cadmium-induced cellular toxicity. J. Toxicol. Environ. Health. 7, 149 - 158 (1981)

Stacey, N.H., Klaassen, C.D.: Inhibition of lipid peroxidation without prevention of cellular injury in isolated rat hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 58, 8 - 18 (1981)

Stacey, N.H., Ottenwälder, H., Kappus, H.: CCl_4-induced lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes with different oxygen concentrations. Toxicol. Appl. Pharmacol. 62, 421 - 427 (1982)

Staib, W., Scholz, R. (eds.): Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber. Springer Verlag Berlin, Heidelberg (1968)

Stier, A.: Commentary: lipid structure and drug metabolizing enzymes. Biochem. Pharmacol. 25, 109 - 113 (1976)

Svingen, B.A., Buege, J.A., O'Neal, F.O., Aust, S.D.: The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. J. Biol. Chem. 254, 5892 - 5899 (1979)

Tappel, A.L.: Measurement of and protection from in vivo lipid peroxidation. in: Free radicals in biology. Vol. IV Pryor, W.A. (ed.) Academic Press, New York 1980, 1 - 47

Tateishi, N., Higashi, T.: Turnover of glutathione in rat liver. in: Functions of glutathione in liver and kidney. Sies, H., Wendel, A. (eds.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1978, 3 - 7

Teare, F.W., Jasansky, P., Renaud, L., Read, P.R.: Acute effect of cadmium on hepatic drug-metabolizing enzymes in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 41, 57 - 65 (1977)

Thompson, G.A., Meister, A.: Interrelationship between the binding sites for amino acids, dipeptides and -glutamyl transpeptidase. J. Biol. Chem. 252, 6792 - 6797 (1977)

Thurmann, R.G., Marazzo, D.P., Scholz, R.: Mixed function oxidation and intermediary metabolism: metabolic interdependences in the liver. in: Cytochromes P-450 and b_5. Cooper, D.Y., Rosenthal, O., Snyder, R., Witmer, C. (eds.) Plenum Press, New York, London 1975, 355 - 367

Thurmann, R.G., Kauffman, F.C.: Factors regulating drug metabolism in intact hepatocytes. Pharmacol. Rev. 31, 229 - 251 (1980)

Tsuchiya, K., King Sted, S.,Hamagami, C.: Cadmium studies in Japan: a review. Elsevier/North-Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, Oxford (1978)

Wada, O., Ono, T., Nagahashi, M., Yamaguchi, N.: Dose-response relationships in cadmium exposure: influence of cadmium administration on SH-group concentration in a protein fraction from tissues of mice. in: Effects and dose-response relationships of toxic metals. Nordberg, G.F. (ed.) Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam 1976, 386 - 391

Webb, M.: The metallothioneins (Chap. 6) 195 - 266; Interactions of cadmium with cellular components (Chap. 8) 285 - 340; Toxicology of cadmium-thionein (Chap. 10) 423 - 432. in: The chemistry, biochemistry and biology of cadmium. Webb, M. (ed.) Elsevier/North - Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford 1979

Weddle, C.C., Hornbrook, K.R., McCay, P.B.: Lipid peroxidation and alteration of membrane lipids in isolated hepatocytes exposed to carbon tetrachloride. J. Biol. Chem. 251, 4973 - 4978 (1976)

Wellner, D., Meister, A.: Disorders of glutathione metabolism. Annu. Rev. Biochem. 50, 948 - 949 (1981)

Wendel, A.: Glutathione peroxidase; in: Enzymatic basis of detoxication. Vol. 1 Jakoby, W.B. (ed.) Academic Press, New York 1980, 333 - 348

Weser, U., Rupp, H., Donay, F., Linnemann, F., Voelter, W., Voetsch, W., Jung, G.: Characterization of Cd, Zn-thionein (metallothionein) isolated from rat and chicken liver. Eur. J. Biochem. 39, 127 - 140 (1973)

Wilbur, K.M., Bernheim, F., Shapiro, O.W.: The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. Arch. Biochem. Biophys. 24, 305 - 313 (1949)

Winterbourn, C.C.: Hydroxyl radical production in body fluids. Roles of metal ions, ascorbate and superoxide. Biochem. J. 198, 125 - 131 (1981)

Yoshimura, S., Komatsu, N., Watanabe, K.: Purification and immunohistochemical localization of rat liver glutathione peroxidase. Biochim. Biophys. Acta 621, 130 - 137 (1980)

Zimmermann, R., Flohé, L., Weser, U., Hartmann, H.-J.: Inhibition of lipid peroxidation in isolated inner membrane of rat liver mitochondria by superoxide dismutase. FEBS Lett 29, 117 - 120 (1973)

Tabellarischer Lebenslauf

22. 5. 53	in Wertheim geboren
ab Frühjahr 60	Besuch der Volksschule in Wertheim
ab Frühjahr 64	Besuch des humanistischen Gymnasiums in Wertheim
13. 6. 72	Abitur
ab Herbst 72	Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Gießen bis zum Vordiplom
ab Herbst 74	Fortsetzung des Studiums an der Universität Hohenheim
ab Herbst 76	Studium der Medizin an der Universität Marburg bis zum Physikum
ab Frühjahr 78	Fortsetzung des Studiums an der Universität Düsseldorf
8. 6. 82	Approbation
seit Juli 82	Assistenzärztin am St. Hedwig Krankenhaus in Gelsenkirchen